

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

FRACTIONNEMENT PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER DU VENIN DE *VIPERA RUSSELLII*. PROPRIÉTÉS ET DOSAGES DES FACTEURS COAGULANT ET ANTICOAGULANT DE CE VENIN

par E. GRASSET et D.-E. SCHWARTZ (*).

(*Institut d'Hygiène de l'Université de Genève.*)

Les venins de nombre de serpents paraissent exercer, soit *in vitro*, soit *in vivo*, une action complexe sur la coagulation du sang ; tels sont parmi les vipéridés le venin de *Vipera aspis* d'Europe, de *Vipera russellii* d'Asie, du *Bitis gabonica* d'Afrique équatoriale ; il en est de même de certains crotalidés d'Amérique, et colubridés d'Australie (*Notechis* et *Pseudechis*) [1].

Il semble en effet que, pour certains de ces venins, l'action d'un principe anticoagulant vienne se superposer à celle d'un principe coagulant. De ce fait, suivant les conditions d'expérience, l'un ou l'autre de ces facteurs peut apparaître dominant.

En 1928, Brazil et Vellard [2] remarquent dans le test de coagulation du sang *in vitro*, que certains de ces venins sont coagulants aux faibles concentrations, alors qu'ils se montrent anticoagulants à des concentrations plus élevées.

In vivo, le phénomène est inverse : injecté à faible dose dans les veines, le venin produit généralement l'incoagulabilité du

(*) Manuscrit reçu le 26 novembre 1954.

sang, alors qu'à des doses élevées, il engendre la mort instantanément par thrombose.

Le venin de *Vipera russellii* (Daboïa), vipère des Indes, que nous avons plus particulièrement étudié, bien connu pour son haut pouvoir coagulant, se range aussi, comme nous allons le montrer, dans la catégorie des venins possédant une action ambivalente sur la coagulation du sang.

C'est Lamb [3] qui, le premier, reconnut le pouvoir coagulant du venin de *Vipera russellii*. Cet auteur montre en effet que l'injection intraveineuse au lapin de doses élevées de ce venin provoque la mort par thrombose vasculaire et cardiaque.

Selon Edsall [4] le principe responsable de cette action agirait en accélérant, en présence de calcium, la synthèse de la thrombine plasmatique.

En ce qui concerne les propriétés anticoagulantes du venin de *Vipera russellii*, Lamb observe que des injections répétées de faibles doses de ce venin entraînent l'incoagulabilité du sang.

Ce phénomène est imputé à une précipitation du fibrinogène sur les hématies [5 a] et les endothéliums vasculaires [5 b]. L'existence d'un principe anticoagulant dans le venin de *Vipera russellii* n'était donc pas démontrée.

En dehors de l'action coagulante, divers auteurs ont également signalé les effets hémolytiques, hémorragiques, neuro-toxiques et protéolytiques de ce venin. Contrairement aux principes coagulant et anticoagulant qui peuvent être aisément dosés *in vitro*, l'existence de ces autres facteurs repose pour une bonne part sur les observations symptomatologiques au cours de la période d'intoxication et sur les caractères des lésions histo-pathologiques à l'autopsie. Il est parfois difficile de doser ces facteurs et d'apprécier leur importance relative dans les phénomènes d'intoxication. On peut dans certains cas se demander si à chaque action physiopathologique ainsi plus ou moins arbitrairement définie, correspond bien une seule entité biochimique.

Il nous est donc apparu intéressant de rechercher si, par le fractionnement du venin, il était possible de mettre plus clairement en évidence ces différents principes, d'en étudier le mode d'action et de voir dans quelle mesure les diverses actions physiopathologiques du venin pouvaient être dissociées.

Gosh, Dé et Ray [6] fractionnent le venin de *Vipera russellii* par précipitation saline, adsorption et électrodialyse.

L'électrophorèse Tiselius telle qu'elle est appliquée au fractionnement des venins de cobras par Polson, Joubert et Haig [7] a le désavantage de nécessiter l'emploi de quantités considérables de venin. Certains travaux ont déjà montré que l'électrophorèse sur papier pouvait être utilisée pour le fractionnement des venins d'insectes ou de serpents (Wieland et Wirth [8], Grassmann [9],

Neumann et Habermann [10], Grassmann et Hannig [11]). L'électrophorèse sur papier ne nécessite que des quantités minimales de substance ; elle offre en outre l'avantage de fixer sur un support solide les différentes fractions qui peuvent être ensuite, comme dans la chromatographie, révélées puis éluées et dosées individuellement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Venin.* — L'échantillon de 5 g de venin de *Vipera russellii* que nous avons utilisé provenait des Indes, d'une source sûre. Le venin, desséché au vide sur P_2O_5 , avait été réduit en fines paillettes de manière à former un mélange homogène.

Conservation des propriétés coagulantes du venin. — A l'état sec, le venin a conservé parfaitement ses propriétés biologiques.

En solution, l'activité du venin, en particulier son activité coagulante, peut disparaître plus ou moins rapidement. Nous avons observé que le développement de bactéries préexistantes, vraisemblablement dans le venin desséché, était souvent la cause principale de cette désactivation.

Le thymol empêche la croissance des bactéries ; il permet de conserver le venin de *Vipera russellii* en solution dans l'eau distillée à 4° C en récipient fermé durant plusieurs mois, sans perte appréciable de son activité coagulante.

Une autre cause bien connue de désactivation des venins est l'oxydation. En ce qui concerne le principe coagulant du venin de *Vipera russellii*, nous avons pu constater que l'eau oxygénée, même à 1 p. 1 000, détruisait cette activité en l'espace de quelques heures à température ordinaire et à pH 6. Cette désactivation est encore fortement accélérée en présence de traces de métaux (Cu ; Fe ; Ni).

Les réducteurs préviennent l'oxydation par l'air et peuvent de ce fait être utiles pour la conservation des venins, en particulier dans la zone des pH alcalins. Cependant, certains auteurs [12] ont montré que le sulfite de soude ou la cystéine entraînaient dans certains cas une perte appréciable des propriétés neurotoxiques des venins. Afin de conserver si possible l'activité intégrale du venin, nous avons préféré l'emploi d'un stabilisateur, le thioglycol (1).

FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE DU VENIN. — a) *Appareil.* — Nous avons utilisé l'appareil Elfor H (2). Le chevalet supportant les bandes de papier est modifié de façon à recevoir une seule bande de 8 cm de large ; celle-ci est tendue horizontalement. L'appareil d'ionophorèse est placé dans une enceinte frigorifique à 4° C pour éviter autant que possible une désactivation par suite de l'échauffement du papier.

b) *Solutions tampon.* — Tampon au véronal selon Michaelis, soit encore un tampon au véronal monosodique + acide barbiturique, pH 8 à 9,3. Force ionique 0,1. Ces tampons sont additionnés de 5 p. 1 000 de thioglycol et de quelques cristaux de thymol.

c) *Solution de venin.* — On prépare dans de l'eau distillée froide,

(1) 2,2' thioldiéthanol, Eastman Kodak and Co, Rochester, N.-Y., U.S.A.

(2) Bender et Hobein, Zürich.

thymolée et renfermant 5 p. 1 000 de thioglycol, une solution à 25 p. 100 de venin. On centrifuge dans un petit tube pour éliminer une partie insoluble du venin (3) et prélève la solution surnageante.

d) *Révélation et élution des fractions.* — Après migration la bande d'électrophorèse est découpée en deux dans le sens de sa longueur, au moyen d'une paire de ciseaux siliconés (4) : une partie est révélée à l'amido-schwarz ou à la ninhydrine, elle permet de repérer la position des différentes fractions ; l'autre est partiellement séchée dans un courant d'air puis conservée encore légèrement humide au frigidaire, elle est ensuite placée parallèlement à la bande révélée, les fractions sont découpées et éluées au moyen d'eau physiologique thymolée.

MÉTHODE DE DOSAGES. — 1° *Dosage de l'activité coagulante du venin de Vipera russellii.* — En utilisant un plasma donné dans lequel la teneur des différents facteurs de la coagulation du sang peut être considérée constante, il est possible de mesurer l'activité d'une préparation de thromboplastine par rapport à une préparation standard d'activité connue de cette même substance.

C'est sur ce principe que Fischer [13], plus tard Feissly [14] et Owren [15] ont développé un test d'activité de la thromboplastine d'extraction de cerveau. Ces auteurs montrent qu'en portant en graphique les log. de concentration de thromboplastine en fonction du log. du temps de coagulation, on obtient une droite.

En nous plaçant dans des conditions semblables, nous avons pu constater que le venin de *Vipera russellii* se comportait quelque peu différemment. Dans ce cas la courbe de régression n'est pas parfaitement linéaire. La raison de cette différence de comportement entre la thromboplastine d'extraction de cerveau et le principe coagulant du venin de *Vipera russellii* ne semble pas connue.

Nous avons recherché les conditions qui permettent dans le cas du venin de réduire cette courbe à une fonction linéaire. Ceci semble être le cas lorsqu'on emploie le plasma oxalaté de cobaye et que l'on exprime le log. de concentration du venin en fonction directe du temps de coagulation (celui-ci est choisi de préférence dans l'intervalle de vingt à trente-cinq secondes).

En nous référant à une solution de venin brut de *Vipera russellii*, utilisé comme standard, cette méthode de dosage nous a permis de rechercher l'activité coagulante dans les diverses fractions du venin et d'étudier sa stabilité.

a) *Préparation du plasma.* — A l'aide d'une aiguille (n° 5) siliconée montée sur une seringue siliconée de 10 ml, nous avons prélevé exactement 1 ml d'oxalate de soude 0,1 n, puis, par ponction intracardiaque sur cobaye mâle, on prélève lentement 9 ml de sang, qui est mélangé immédiatement à l'oxalate en retournant plusieurs fois la seringue. On centrifuge dix minutes à 2 800 t/min. à 15° C. Le plasma est prélevé à l'aide d'une pipette et dilué avec 2 volumes d'eau physiologique (8,5 p. 1 000).

(3) Ce précipité représente environ 7 p. 100 du venin total. Il est sans activité biologique.

(4) Tout contact direct du métal sur la bande doit être évité.

Le plasma doit être utilisé dans les trois heures qui suivent la prise de sang.

b) *Préparation du standard de référence.* — Etant donné la stabilité du venin à l'état sec et ses propriétés coagulantes particulières, nous avons choisi le venin brut desséché comme standard. La solution du standard est préparée fraîchement avant chaque dosage, en même temps que le plasma.

On dissout rapidement dans un tube à centrifuger en agitant au moyen d'une baguette de verre 10 mg de venin dans 5 cm³ d'eau physiologique à 0° C et préalablement additionnée de quelques cristaux de thymol. Un léger précipité sans activité biologique reste en suspension (5 à 7 p. 100 du venin). On l'élimine par centrifugation. La solution claire est additionnée de son volume de CaCl₂ 0,025 n. On a ainsi une solution de venin d'une concentration approximative de 1 : 10 000 (= 10⁻⁴). A partir de cette solution, on prépare une échelle logarithmique de dilutions 10^{-4,4} ; 10^{-4,8} ; 10^{-5,6} ; 10⁻⁶ ; en prenant par exemple 0,6 ml de la solution précédente + 0,9 ml d'un mélange de concentration finale NaCl physiologique et CaCl₂ 0,025 n. On prépare parallèlement et de la même façon une échelle de dilutions des échantillons à examiner.

c) *Dosage.* — Dans des éprouvettes plongées dans un thermostat à 37° C on introduit 0,3 ml de la solution de plasma. Après une minute on ajoute en soufflant énergiquement au moyen d'une pipette 0,2 ml de la solution de venin + calcium maintenue à 20° C. Simultanément, on met en marche un chronographe. On homogénéise dans les secondes qui suivent en agitant l'éprouvette et l'on introduit un crochet de verre auquel on imprime un lent mouvement continu le long du tube. On arrête le chronographe au moment de la formation du caillot. En portant sur un graphique les temps de coagulation obtenus d'une part avec le standard, d'autre part avec l'échantillon d'activité inconnue contre le log. de concentration de ces solutions, on obtient deux droites parallèles. L'activité est alors exprimée en pour cent du standard ; elle est donnée directement par le rapport de concentration des solutions de l'échantillon et du standard donnant le même temps de coagulation.

2° *Dosage d'activité anticoagulante du venin.* — Méthode à la throm-

bine. — a) *Fibrinogène.* — Solution fraîche de fibrinogène Roche à 0,5 p. 100 dans une solution tampon phosphate + NaCl de pH 7,5 et de force ionique physiologique ($\mu = 0,146$). Centrifuger dix minutes à 3 000 t/min. et conserver froid avant le dosage.

b) *Thrombine.* — Solution fraîche de thrombine Roche à 300 μ g/ml dans de l'eau physiologique à 8,5 p. 1 000.

c) *Venin.* — Solution à 2 p. 1 000 dans de l'eau physiologique à 8,5 p. 1 000.

MÉTHODE. — Nous avons utilisé la technique suivante :

On détermine tout d'abord la concentration d'une solution de thrombine qui donne sur la solution de fibrinogène un temps de coagulation d'environ dix-sept secondes. Ensuite, on ajoute dans une série de tubes placés au thermostat à 37° C et renfermant 0,3 ml de solution de fibrinogène, 0,2 ml d'une solution mélange renfermant la quantité pré-

choisie de thrombine (quantité qui seule donne un temps de coagulation de dix-sept secondes) plus une quantité variable de venin (ou d'une de ses fractions). On agite aussitôt le tube pour homogénéiser, introduit un crochet de verre auquel on imprime un lent mouvement le long du tube. On arrête le chronographe au moment de la formation du gel de fibrine.

Le venin total ainsi que la fraction 3 donnent dans ce test un retard net de la coagulation (temps de coagulation = soixante secondes).

3° *Dosage d'activité protéolytique.* — *Test de liquéfaction de la gélatine.* — On dépose délicatement sur une plaque stérile et thymolée de gélatine à 20 p. 100 une goutte de solution aqueuse ou saline physiologique thymolée de venin ou d'une de ses fractions. On laisse agir deux à trois jours à température ambiante.

Remarque : Il est très important d'utiliser pour ce test des solutions fortement thymolées, le thymol prévenant la croissance de bactéries protéolytiques dont l'action viendrait fausser les résultats.

RÉSULTATS.

Nous avons obtenu par électrophorèse sur papier du venin de *Vipera russellii* entre les pH 8 et 9,3 une séparation en 8 fractions (dont 5 plus importantes du point de vue quantitatif), toutes révélabiles à l'amido-schwarz ou à la ninhydrine. La séparation aux pH acides est trop lente, elle devient progressivement plus rapide lorsqu'on s'élève dans l'échelle des pH alcalins. L'expérience nous a montré que dans les conditions dans lesquelles nous travaillons l'activité, et en particulier l'activité coagulante du venin, pouvait être conservée. Après électrophorèse nous retrouvons 60 à 70 p. 100 de l'activité coagulante de départ, dont 75 à 80 p. 100 liée à la fraction 3 et le reste (soit 20 à 25 p. 100) à la fraction 4. La fraction 5 est anticoagulante.

En admettant avec Machebœuf [46] que le glucose dans la ionophorèse sur papier échappe à l'influence du courant et qu'il subit un déplacement uniquement dû au courant liquide (dû à l'évaporation et à l'électroendosmose), il est possible au moyen de glucose, mélangé au venin et utilisé comme point de repère, de connaître la charge approximative des protéines présentes et de se faire une idée sur leurs points isoélectriques. En nous basant sur ce principe, nous avons pu vérifier qu'entre les pH 8 et 9,3 le venin de *Vipera russellii* se laissait séparer en 5 composantes principales dont deux de migration *anodique* (fractions 3 et 4) et trois de migration *catodique* (fractions 5, 6 et 7).

La fraction 3 (principe coagulant) migre encore anodiquement au pH 6 et son point isoélectrique est donc inférieur à cette valeur. La fraction 5 (anticoagulante) aurait un point isoélectrique légèrement supérieur au pH de 9.

Ces composantes isolées sont homogènes à l'électrophorèse sur papier (fig. 1).

PROPRIÉTÉ DU VENIN

ET DE SES FRACTIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES « IN VITRO ».

1° ACTION COAGULANTE. — A une dilution de 1:10 000 et au-delà le venin possède un haut pouvoir coagulant sur le plasma oxalaté, de même qu'il est coagulant en présence de prothrombine

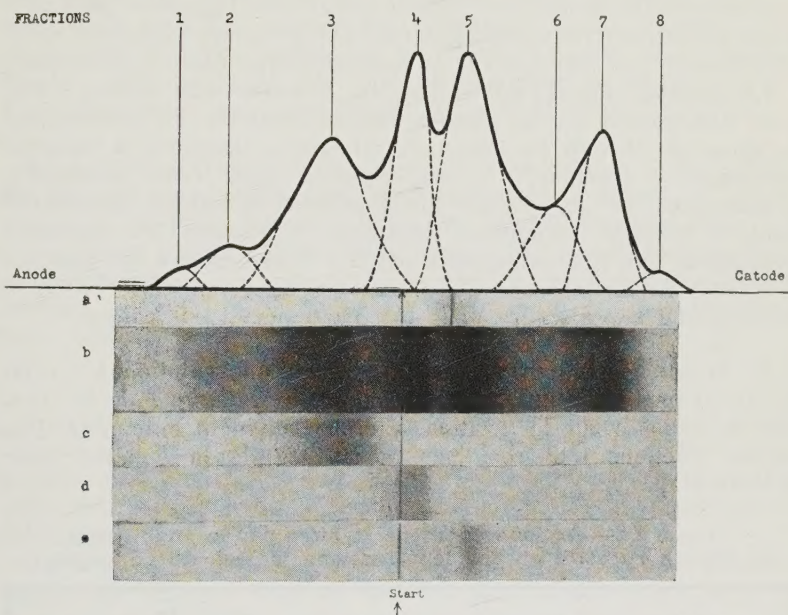


FIG. 1. — Electrophorèse sur papier du venin de *Vipera russellii*. Tampon Michaelis pH = 9,3, $\mu = 0,1$. Bande de 8 cm de large, 3mA, 110 V. 20 heures. Révélation des protéines à l'amido-schwarz. a : Glucose (révélé à l'anhydride phthalique) : point de migration zéro; b : Venin brut de *Vipera russellii*; c, d, e : Fractions 3, 4 et 5, séparées par électrophorèse préparative et soumises à nouveau après élution au chlorure de sodium physiologique, dialyse contre une solution de glucose à 5‰ et lyophilisation, à une nouvelle migration électrophorétique dans les mêmes conditions.

sur le fibrinogène. Cette action n'est pas sensiblement diminuée ni par addition de Complexon II, ni par l'oxalate de soude. L'addition de ions Ca^{++} n'est pas nécessaire à la manifestation de son activité coagulante.

Contrairement au venin brut, la fraction coagulante (fraction 3), isolée par électrophorèse, ne semble agir qu'après addition d'ions calcium. Par électrodialyse prolongée à pH 5 à 7 d'une solution à 1 p. 1 000 de venin additionné de thymol et de thioglycol, on n'observe aucun passage de l'activité coagulante à travers des

membranes « Cellux » ou de gélatine. L'activité coagulante, après addition d'ions calcium, se retrouve intégralement dans le compartiment médian.

2° ACTION ANTICOAGULANTE. — Le venin brut inhibe *in vitro* l'action de la thrombine sur le fibrinogène. Cette action anticoagulante du venin est masquée dans la réaction sur le plasma, conditions dans lesquelles l'activité coagulante l'emporte généralement sur son activité anticoagulante. Elle peut être facilement mise en évidence par réaction sur le système fibrinogène + thrombine.

La fraction anticoagulante (fraction 5) exerce son action, d'une part directement sur le plasma oxalaté recalcifié en prolongeant le temps de Howell (= temps de calcium = cinquante à soixante secondes ; + fraction 5 = cent vingt à deux cents secondes), d'autre part sur le système fibrinogène + thrombine (thrombine seule = dix-sept secondes ; thrombine + fraction 5 = soixante secondes). Par électrodialyse à pH 5 à 7 on observe un passage à travers les membranes « Cellux » et de gélatine de l'activité anticoagulante qui migre dans le compartiment cathodique.

3° ACTION PROTÉOLYTIQUE. — 1 goutte d'une solution à 1 : 200 de venin brut ou d'une solution saline physiologique de la fraction 3, déposée sur la gélatine, y creuse un petit entonnoir. Les autres fractions n'altèrent pas la surface de la gélatine (voir tableau I).

TABLEAU I. — Actions exercées *in vitro* par le venin total de *Vipera russellii* et par les fractions isolées de ce dernier.

	VENIN total	FRACTIONS				
		3	4	5	6	7
Action sur le plasma oxalaté.	C	C	(c)	A	(a)	O
Action sur le système : Fibrinogène Prothrombine Ca	C	C	(c)	A	(a)	O
Action sur le système : Fibrinogène Thrombine	A	O	O	A	(a)	O
Action protéolytique sur la gélatine	P	P	O	O	O	O

A = action anticoagulante P = action protéolytique (a) = faiblement anticoagulante
C = action coagulante O = action nulle (c) = faiblement coagulante

PROPRIÉTÉS DU VENIN

ET DE SES FRACTIONS ÉLECTROPHORÉTIQUES « IN VIVO ».

1° ACTION COAGULANTE. — L'injection intraveineuse de 0,25 mg de venin ou d'une même activité coagulante sous forme de sa fraction coagulante, dose certainement mortelle (CLD) pour un lapin de 1 000 g, entraîne instantanément la mort de cet animal par thrombose vasculaire et cardiaque. Cette action immédiate coagulante peut être inhibée par l'héparine ou par d'autres anticoagulants du type sulfate de dextrane. Comme nous l'avons montré, cette propriété peut être utilisée pour le dosage *in vivo* d'anticoagulants semi-synthétiques (Grasset et Schwartz [47]).

2° AUTRES ACTIONS. — Par injection sous-cutanée à des souris de 18-20 g nous avons cherché à mettre en évidence les effets respectifs et l'importance relative de chaque fraction dans les phénomènes d'intoxication. Nous avons noté les différences dans le comportement des animaux ainsi que les caractères des lésions causées par l'injection du venin et de ses différentes fractions (voir tableau II).

DISCUSSION.

L'existence simul'année, mise en évidence par l'électrophorèse, dans le venin de *Vipera russellii* de deux principes à action antagoniste (5), l'un *coagulant*, l'autre *anticoagulant*, expliquerait qu'il soit possible d'obtenir *in vitro* des effets apparemment contradictoires.

Le test de coagulation *in vitro* se pratique sur une quantité limitée de plasma. Dans ce test on peut admettre que la prothrombine présente est entièrement transformée en thrombine sous l'action du principe coagulant du venin ; au fur et mesure de sa formation la thrombine est bloquée par le principe anticoagulant du venin.

Il est à remarquer que si l'on augmente la concentration du venin on n'augmente pas la quantité de thrombine formée, puisque celle-ci dépend seulement de la quantité de plasma mise en jeu, par contre on augmente la concentration de l'antithrombine du venin. C'est ainsi que l'on parvient à un seuil où la thrombine libérée est entièrement neutralisée par l'antithrombine du venin. Il apparaît donc possible par le test de coagulation *in vitro* de connaître le rapport d'activité coagulante et anticoagulante d'un même venin, tel qu'il existe dans le venin de *Vipera russellii*.

(5) Des expériences récentes nous ont permis de mettre également en évidence dans le venin de *Vipera aspis* deux principes distincts, coagulant et anticoagulant. Ces travaux feront l'objet d'une prochaine publication par T. Brechbühler et E. Pongratz avec les présents auteurs.

TABLEAU II.

	DOSE MORTELLE (en mg. pr. souris de 20 g. (¹) (inj. s. c.)	MORT après :	A. COMPORTEMENT DE L'ANIMAL PENDANT LA PÉRIODE D'INTOXICATION B. AUTOPSIE : LÉSIONS
Venin total	250	2 h. 20	A. Excitation passagère. B. Au niveau de la zone d'injection suffusion hémorragique foncée.
Fraction 3	156	3 h. 20	A. Tuphos, parésie des membres postérieurs. B. Plaque hémorragique étendue (rouge laqué) sur le flanc du côté de l'injection.
Fraction 4	625	6 h. 30	A. Excitation passagère. Symptômes neurotoxiques s'aggravant progressivement. B. Pas de lésion visible.
Fraction 5	2 500	10-20 h.	A. Animal affaibli, parésie des membres postérieurs. B. Estomac et intestins renfermant pigments biliaires, foie pâle, surrénales hyperhémées.
Fraction 7	2 500	survie	A. Aucun signe particulier. B. id.

(¹) Poids en matière protéique, estimé par microdosage d'azote après extraction au benzène de l'acide barbiturique à pH 6.

CONCLUSIONS.

1° Le venin de *Vipera russellii* renferme un principe *coagulant* (analogue à une trombokinase) et un principe *anticoagulant* (analogue à une antithrombine). La présence de ces deux facteurs est démontrée par l'étude des propriétés du venin brut et de ses fractions électrophorétiques.

2° Le venin de *Vipera russellii* est séparé par électrophorèse sur papier entre les pH 8 et 9,3 en 8 fractions dont 5 principales ; celles-ci sont éluées et leur activité respective testée *in vitro* et *in vivo*.

3° L'activité anticoagulante du venin se retrouve dans la fraction catodique 5, 80 p. 100 de l'activité coagulante dans la fraction anodique 3, 20 p. 100 dans la fraction anodique 4 ; l'activité protéolytique sur la gélatine dans la fraction anodique 3.

4° Dans les conditions de nos expériences, il n'a pas été possible de dissocier l'activité coagulante de la fraction 3 de son activité protéolytique.

Nous remercions M. le Dr C. H. Haselbach de tout l'intérêt qu'il a pris à ces recherches ainsi que des microdosages d'azote et des électrodialyses effectués à l'Ecole de Chimie de Genève.

Nos remerciements vont aussi au Département scientifique de la maison Hoffmann-La Roche, Bâle, pour le fibrinogène et la thrombine utilisés dans ces essais.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. PHISALIX. *Animaux venimeux et venins*, 1922, **2**, 675-680, Masson, Paris.
- [2] V. BRAZIL et J. VELLARD. *Ces Annales*, 1928, **42**, 403.
- [3] G. LAMB et HANNA. *Some observations on the poison of Russell's Viper*, 1903, p. 49, Calcutta.
- [4] G. EDSALL. *Amer. J. Physiol.*, 1941, **134**, 609.
- [5 a] L. AQUINO. *C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 1531.
- [5 b] B. A. HOUSSAY et A. SORDELLI. *Rev. Inst. Bact.*, 1919, **2**, 1.
- [6] B. N. GOSH, S. S. DÉ et P. C. RAY. *Science et Culture*, 1939, **4**, 738.
- [7] A. POLSON, F. J. JOUBERT et D. A. HAIG. *Biochem. J.*, 1946, **40**, 265.
- [8] T. WIELAND et L. WIRTH. *Ang. Chem.*, 1950, **62**, 473.
- [9] W. GRASSMANN. *Naturwiss.*, 1951, **38**, 200.
- [10] W. NEUMANN et E. HABERMANN. *Ibid.*, 1952, **39**, 286.
- [11] W. GRASSMANN et K. HANNIG. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1954, **296**, 30.
- [12] F. MICHAËL et H. SCHMITZ. *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1938, **71**, 703 et 1446.
- [13] A. FISCHER. *Biochem. Zeitschr.*, 1935, **278**, 320.
- [14] R. FEISSLY. *Schweiz. med. Wschr.*, 1947, **77**, 427.
- [15] P. A. OWREN. *Acta Med. Scand.*, suppl., 1947, 194.
- [16] M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE, J.-M. DUBERT et M. BRUNERIE. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 334.
- [17] E. GRASSET et D. E. SCHWARTZ. *Rev. Suisse Path. gén. Bact.*, 1954, **47**, 4, 514-520.
- [18] R. A. BOISSONNAS et C. H. HASELBACH. *Helv. Chim. Acta*, 1953, **36**, 576.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA VIRULENCE ET DU POUVOIR TOXIGÈNE DU VIBRION CHOLÉRIQUE

II. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE D'INCUBATION SUR LE POUVOIR TOXIGÈNE *IN VITRO* DE *VIBRIO CHOLERA*E (OGAWA)

par J. GALLUT et A. JUDE (*)

(Institut Pasteur et Laboratoire Central de Bactériologie
de l'Armée.)

Dans la première partie de ce travail [1], nous avons indiqué que l'augmentation de la virulence du vibron cholérique, sous l'influence de la température d'incubation, était vraisemblablement due à une augmentation de son pouvoir toxigène. Nous n'avons pas constaté, en effet, pour *V. cholerae* (Ogawa) de modification antigénique identique à celle observée chez *Salmonella typhi* [2, 3].

Une première expérience a confirmé cette opinion : des vibrions de la souche H.1-41 ont été cultivés aux trois températures, 18°, 37° et 41°5, tués ensuite par chauffage à 100° pendant cinq minutes, et inoculés par voie péritonéale à des souris ; les DL_{50} correspondant à ces trois températures ont été les suivantes :

Vibrions cultivés à 18° : $DL_{50} = 9 \times 10^9$ (+ 13,0 — 6,2)
Vibrions cultivés à 37° : $DL_{50} = 14 \times 10^9$ (+ 19,6 — 10,0)
Vibrions cultivés à 41°5 : $DL_{50} = 13,6 \times 10^9$ (+ 19,0 — 9,7)

Dans les conditions de notre expérience, ces résultats ne présentent pas de différences statistiquement significatives. Cependant, la dose létale la plus basse indiquant une toxicité plus grande, et aussi plus régulière, correspond à la température d'incubation des vibrions à 18°. Comme il se pourrait que le chauffage à 100° pendant cinq minutes ait détruit la fraction thermolabile de la toxine [4] et supprimé une partie de son action, nous avons procédé à l'étude de la toxine totale, obtenue

(*) Société de Microbiologie, séance du 4 novembre 1954.

à différentes températures, dans les conditions déjà rapportées par l'un de nous [5, 6].

EXPÉRIMENTATION.

1° *Souche*. — Nous avons choisi le vibron cholérique B 144 parmi les 40 souches isolées par Burrows et Lankford, dont nous avons dosé la toxicité antérieurement [5], bien que ce vibron ne se soit pas montré le plus toxique (DL_{50} : 0,057 cm³, titre : 17,5), mais parce que cette souche provient de la période terminale du seul cas de choléra mortel de cette série d'isolements, et aussi parce qu'elle s'est montrée la plus virulente (DL_{50} minima à 18° = $1,1 \times 10^8$) des cinq souches essayées précédemment [4]. Ce vibron 144 possède tous les caractères classiques de *V. cholerae* type Ogawa, forme S. Nous avons vérifié que les cultures ne présentaient aucune tendance à la variation S → R à chacune des trois températures, 18°, 37° et 41°.

2° *Préparation de la toxine*. — Comme précédemment, nous avons utilisé la technique de Bernard et Gallut [7] suivant les modalités déjà décrites pour la température de 37°. Rappelons que chaque centimètre cube de toxine correspond à l'équipement toxique de 800×10^9 vibrions, cultivés au préalable sur gélose peptonée pendant seize à dix-huit heures, et mis en suspension en eau salée physiologique glucosée. Cette teneur de germes nécessite un taux déterminé de glucose (5 p. 1 000) pour produire une acidité de fermentation (pH 5,8) mortelle pour le vibron au bout d'un temps variable suivant la température.

A 37° tout le glucose est consommé en quatre heures (J. Blass [8]), temps auquel correspond le maximum de toxicité.

A 41° l'horaire optimum est sensiblement le même. Nous avons donc adopté à cette température les mêmes temps de culture préalable (seize à dix-huit heures) et de fermentation du glucose (quatre heures).

A 18-20° par contre, le temps de culture doit être porté à trente-six ou quarante heures pour obtenir une récolte du même ordre de grandeur qu'à 37°. La fermentation est également ralentie et il persiste encore des traces de glucose de la vingtième à la vingt-huitième heure. Nos divers titrages ont été faits à cette température entre vingt et quarante heures de fermentation.

3° *Toxines titrées*. — Au total douze préparations de toxines ont été titrées, soit :

a) Cinq toxines préparées à 18-20° (vingt heures, vingt-quatre heures, vingt-quatre heures, vingt-huit heures, quarante heures, quarante heures) avec la souche 144 constamment maintenue à cette température depuis sa réception à notre laboratoire (7 mai

1953), soit lyophilisée, soit en gélose profonde en tube scellé, à l'obscurité et sans repiquage.

b) Trois toxines préparées à 37° (quatre heures) : la première dès la réception de la souche ; la deuxième avec la souche maintenue à 20° durant cent cinquante-six jours dans les mêmes conditions que ci-dessus ; la troisième avec la souche précédemment lyophilisée, cultivée ensuite à 37° pendant trente jours en eau peptonée avec repiquages quotidiens.

c) Deux toxines préparées à 41° (quatre heures) avec la souche précédemment lyophilisée, cultivée ensuite en eau peptonée à 41° pendant trente et soixante jours, soit 30 et 55 repiquages.

d) Deux toxines préparées à 18°-20° (vingt-quatre heures) avec la souche précédemment lyophilisée, cultivée d'abord à 41° pen-

TABLEAU I. — Titrages de la toxine *V. cholerae* Ogawa n° 144.

n° de l'essai	température d'incubation de la toxine	durée (j.) du stockage de la souche	nombre de repiquages de la souche	DL ₅₀ (cm)	limites de confiance supér--infér	titre de la toxine
3	18°-20°	278	0	0,024	0,042--0,013	41,6
4		281	0	0,015	0,033--0,006	65,6
5		288	0	0,020	0,033--0,011	50,0
6		288	0	0,025	0,043--0,014	40,0
7		294	0	0,019	0,041--0,008	52,6
1	37°	31	0	0,057	0,148--0,021	17,5
2		156	0	0,050	0,087--0,028	20,0
8		291	30 (à 37°)	0,057	0,091--0,035	17,5
9	41°	291	30 (à 41°)	0,40	0,60 --0,26	2,5
12		296	55 (à 41°)	0,218	0,265--0,178	4,5
10	20°	243	30 (à 41°) +7 (à 20°)	0,145	0,268--0,078	6,8
11		237	30 (à 41°) +25 (à 20°)	0,145	0,246--0,085	6,8

dant trente jours (30 repiquages en eau peptonée), puis à 20° pendant sept à vingt-cinq jours (7 et 25 repiquages en eau peptonée).

4° *Évaluation du titre de la toxine.* — Nous avons adopté la méthode de l'un de nous [9] pour le calcul de la DL₅₀ et de ses limites de confiance.

Comme précédemment nous avons utilisé la souris blanche de 15 g. Un minimum de 24 souris, réparties en 4 lots recevant chacun une dose différente, a servi le plus souvent pour chaque titrage ; certains titrages ont comporté jusqu'à 48 souris réparties en 6 lots. Le titre de la toxine a été évalué en DL_{50} par centimètre cube.

5° *Résultats.* — Ils sont indiqués dans le tableau I et reportés

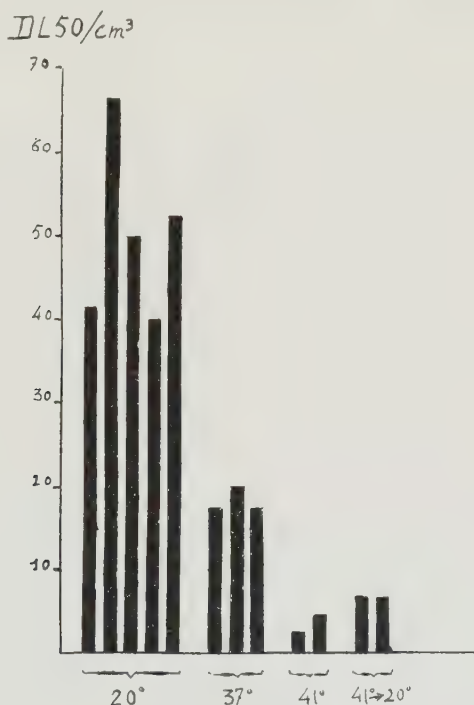


FIG. 1.

graphiquement dans la figure 1. Rapportés à chacun des quatre groupes de toxines précités, ils indiquent donc que :

a) A 18°-20°, les vibrions cholériques élaborent une toxine d'un titre moyen de 50,1 DL_{50} par centimètre cube (41,6, 66,6, 50, 40, 52,6).

b) A 37°, le titre moyen est 18,3 (17,5, 20, 17,5).

c) A 41°, le titre moyen est 3,5 (2,5, 4,5).

d) Les vibrions cultivés à 41° (trente et soixante jours), puis repiqués à 20° (sept et vingt-cinq jours), ont fourni à cette dernière température des toxines de titre égal, soit 6,8.

DISCUSSION.

Notons d'abord la régularité très satisfaisante des résultats se rapportant, dans chacun des quatre groupes précités (*a*, *b*, *c*, *d*), aux toxines produites dans les mêmes conditions de température.

Ainsi, tout au long de nos expériences, la durée de stockage de la souche 144 (prolongée au total sur trois cent vingt-six jours) n'a pas influé sur les résultats qui sont demeurés très homogènes. Cette régularité, qui apparaît assez remarquable pour un spécimen de *V. cholerae*, nous permet de tabler sur les titres moyens, indiqués ci-dessus, et d'en tirer, selon nous, des conclusions valables.

D'autre part, d'un groupe à l'autre, les différences des titres (compte tenu des limites de confiance prévues dans la probabilité 19/20) sont démonstratives entre 20° et 37°, et entre 37° et 41°, respectivement; elles sont statistiquement significatives entre 20° et 41°.

Si donc nous prenons comme base la toxine élaborée par un nombre donné de vibrions 144 à la température usuelle de 37° (titre moyen=18,3), nous constatons qu'un nombre égal des mêmes vibrions élabore à 20° une toxine de titre 2,73 fois plus élevé, et à 41° une toxine de titre 5,2 fois plus faible.

De même si nous prenons comme base la toxine élaborée à 41° (titre moyen=3,5), nous trouvons un coefficient d'augmentation de 5,2 à 37° et de 14,3 à 20°.

Enfin, il apparaît que si la température la plus basse est bien favorable à la toxinogénèse, son action ne peut contrebalancer qu'en partie l'effet défavorable produit sur le vibron cholérique par une culture antérieure à une température élevée. En effet, le titre de la toxine produite à 20° par le vibron 144 cultivé d'abord à 41° pendant trente ou soixante jours, puis repassé à 20° pendant sept ou vingt-cinq jours, non seulement n'atteint plus le titre primitif à 20°, mais encore est inférieur à celui de 37°. Le coefficient d'augmentation de toxicité (toxine 20°/toxine 41°) n'est plus que 1,9 au lieu de 14,3, c'est-à-dire 7,5 fois plus faible.

Pour expliquer ce comportement, on pourrait admettre que les modifications subies par le vibron cholérique à 41° ne sont que partiellement réversibles.

On pourrait envisager aussi une modification transmissible de la souche passée à 41° : la plus grande partie de sa descendance serait définitivement privée de pouvoir toxigène et incapable de l'exalter à nouveau à la température de 20°, tandis qu'une minorité se composerait d'éléments semblables aux éléments initiaux. A l'appui de cette hypothèse, le fait que les titrages des deux toxines du groupe *d*) font apparaître des courbes de toxicité, dont la pente est nettement plus inclinée sur l'horizontale que

celles des autres groupes, et par suite des limites de confiance beaucoup plus étendues, pourrait indiquer que l'inégalité de résistance des animaux est due à l'injection d'une toxine non homogène. Malheureusement, cette hypothèse demanderait pour être vérifiée le titrage d'un nombre suffisant, donc très grand, de toxines préparées chacune avec une souche provenant d'une colonie séparée après le passage à 41°, et nécessiterait par conséquent un nombre d'animaux considérable et prohibitif.

CONCLUSIONS.

L'influence de la température sur la toxinogénèse de *V. cholerae* est démontrée par nos expériences.

D'une part, le pouvoir toxigène varie en raison inverse de la température entre 18°-20° et 41°, et le titre de la toxine à chacune des trois températures considérées, 18-20°, 37° et 41°, s'avère pratiquement fixe pour un vibrion Ogawa maintenu en collection pendant environ un an.

D'autre part, le passage du vibrion cholérique de 20° à 41°, qui se traduit par une baisse très importante de son pouvoir toxigène à la température la plus élevée, produit en outre un effet durable, puisque ce vibrion ramené à la température la plus basse est devenu pratiquement incapable de rehausser sa toxine à la valeur obtenue avec le vibrion témoin maintenu constamment à 20°.

Ces deux ordres de faits nous amènent à penser que les différences de l'équipement toxigène de *V. cholerae*, provoquées par les variations de la température, ont un effet sensiblement durable. Par conséquent, si, comme il est vraisemblable, l'augmentation constatée à basse température *in vitro* de la toxicité du vibrion cholérique reflète, en l'exagérant sans doute, l'hypertoxicité relative des vibrions prélevés chez un malade donné à la phase d'hypothermie du choléra, cette hypertoxicité devient un caractère suffisamment stable pour que nous ayons pu la mettre en évidence [5, 6], même en milieux artificiels à 37°, sur des vibrions maintenus un temps relativement court hors de l'organisme.

Tirons enfin une conclusion pratique de notre travail : le maintien des souches de collection à la température du laboratoire (soit à l'état lyophilisé, soit en culots de gélose profonde en tubes scellés) s'avère particulièrement favorable à la conservation de leur pouvoir toxigène.

RÉSUMÉ.

Le pouvoir toxigène du vibrion cholérique varie suivant la température d'incubation des cultures.

Les toxines les plus actives sont obtenues lorsque la culture est maintenue à 18°-20°, les plus faibles à 41°. Les toxines élaborées à 37° ont une activité intermédiaire.

Les cultures développées à 41°, et qui sont faiblement toxiques, ne peuvent récupérer par passage à 20° qu'une activité partielle, inférieure à celle des cultures développées à 20° et même 37°.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. JUDE et J. GALLUT. *Ces Annales*, 1955, **88**, 145.
- [2] A. JUDE et P. NICOLLE. *Bull. Acad. Méd.*, 1953, **137**, 168.
- [3] A. JUDE, P. NICOLLE. J. et P. SERVANT. *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **238**, 2362.
- [4] J. GALLUT et P. GRABAR. *Ces Annales*, 1945, **71**, 83 et 321.
- [5] J. GALLUT. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237**, 1038.
- [6] J. GALLUT. *Ces Annales*, 1954, **86**, 561.
- [7] P.-N. BERNARD et J. GALLUT. *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 10 et 11.
- [8] J. BLASS. *Ces Annales*, 1946, **72**, 230.
- [9] P. BONÉT-MAURY, A. JUDE et P. SERVANT. *Rev. Immunol.*, 1954, **18**, 21.

ISOLEMENT ET ÉTUDE DES BACTÉRIOPHAGES ACTIFS SUR LES ANAÉROBIES. LEUR RÔLE DANS L'ÉVOLUTION DU PHLEGMON EXPÉRIMENTAL

par A. GUELIN (*).

(Institut Pasteur. Service du Bactériophage.)

Les bactériophages des anaérobies sont rares dans les collections mondiales. L'isolement, en 1934, par Cowles [2] d'un phage tétanique, est demeuré sans suite. En 1938-1940, les chercheurs russes Zaeva, Tzip, Sirbiladze et Djikia ont isolé les premiers bactériophages actifs sur les agents de la gangrène gazeuse : *Cl. perfringens*, *Cl. oedematis*, *Cl. histolyticum*, vibrion septique et *Cl. putrificus*. Dès 1942, ces bactériophages ont été proposés pour compléter le traitement des plaies de guerre (Jouravlev, Kokine et Pokrowskaja, 1944 [9]; Frid, 1945 [4]; Hauduroy, 1946 [7]). En 1947, nous avons, en collaboration avec Kreguer et Le Bris [40], isolé un bactériophage *perfringens* actif sur *Cl. perfringens* (*Welchia perfringens*) type A. Depuis, une série de ces phages, tous différents du point de vue de leurs dimensions et de leur activité, a été isolée dans notre laboratoire.

Nous avons cherché, dernièrement, à définir le rôle du bactériophage *perfringens* dans les processus pathologiques provoqués, chez les animaux, par *Cl. perfringens*. L'effet de la phagothérapie a été traité, pour la première fois, par d'Hérelle [8]. À notre connaissance, il n'existe que le travail de Jouravlev, Kokine et Pokrowskaja [9] sur l'application thérapeutique des bactériophages anaérobies. Les auteurs notent l'effet favorable observé dans le traitement de blessures de guerre par l'association de cinq phages.

Le résultat d'un traitement bactériophagique dépend, en grande partie, de la possibilité d'une rencontre entre les corpuscules phages et les cellules bactériennes au sein d'un organisme. Or, cette rencontre peut être empêchée par des causes multiples, plus ou moins connues.

(*) Manuscrit reçu le 19 octobre 1954.

Nous connaissons mal les conditions dans lesquelles la fixation du phage sur les bactéries peut avoir lieu. Étudiée *in vitro*, cette fixation nécessite la présence d'un grand nombre de germes (Guélin et Lépine [6 bis]). On se demande alors comment elle peut se réaliser *in vivo* car, dans la plupart des cas, l'agent pathogène n'est généralisé ni dans le sang, ni dans les tissus. A moins que le bactériophage y soit introduit directement, son accès au foyer d'infection peut être empêché, soit qu'il soit inactivé par les colloïdes de l'organisme, soit qu'il soit éliminé rapidement.

Le bactériophage, une fois introduit chez l'animal malade, échappe à tout contrôle et l'on ne possède aucune certitude en ce qui concerne sa fixation sur l'agent pathogène. C'est pourquoi nous avons cherché, avant tout, à étudier l'évolution d'un processus pathologique, déterminé par des bactéries ayant préalablement fixé le bactériophage.

Le phlegmon expérimental du cobaye, provoqué par l'injection de *Cl. perfringens* (*Welchia perfringens*), nous a paru tout indiqué pour ce genre d'observation. La localisation extérieure du foyer infectieux, accessible à l'observation directe, permet de suivre l'évolution de l'œdème gangréneux. Ainsi l'effet du bactériophage peut être évalué plus facilement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

La présence des bactériophages *perfringens* a été décelée dans différentes eaux polluées : Seine, Tamise, eaux côtières de la Méditerranée à Nice, égouts de Paris et de Londres. Ils y sont, en général moins nombreux que les bactériophages aérobies et leur recherche doit être faite dans un plus grand volume d'eau. Les mois d'hiver, à journées courtes et peu ensoleillées, sont favorables à la recherche des phages *perfringens*, comme d'ailleurs de tous les phages aérobies.

Le comportement des bactériophages *perfringens*, au cours de leur isolement et de leur entretien, rappelle beaucoup celui des phages aérobies. Du moment que les bactéries sont placées dans les conditions d'anaérobiose nécessaires à leur croissance, le bactériophage se développe en même temps.

Après son introduction dans une culture, la quantité des corpuscules phages baisse rapidement, pour augmenter ensuite après un délai plus ou moins long. L'élévation du titre bactériophagique est plus rapide ici que chez les phages aérobies, probablement à cause de la multiplication très intense de *Cl. perfringens*. Avec certaines souches, la lyse complète des cultures est régulièrement observée ; avec d'autres, elle est moins fréquente et moins complète. En opérant toujours avec le même milieu et avec la même quantité de phages et de bactéries au départ, il

est possible de préciser d'avance le moment de l'élévation maximum du titre phagique et de la lyse de la culture.

La morphologie du phage *perfringens*, étudiée au microscope électronique par Elford (1953 [3]), révèle une structure caractéristique également des phages aérobies : tête arrondie, munie ou non d'une queue plus ou moins allongée. La taille des corpuscules varie suivant le bactériophage. Nous avons, dans notre collection, des phages de 75 et de 40 μ , ainsi que des phages plus petits.

La phagolessine A 58, antibiotique élaboré par *Streptomyces griseus* et décrit par Asheshov, Strelitz et Hall en 1952 [4], semble être moins active sur les phages *perfringens* (50 p. 100) que sur les phages aérobies (79 p. 100) : tandis que ces derniers subissent une inactivation presque complète, celle-ci n'est que partielle pour les phages *perfringens* (Levaditi, Guelin et Vaisman, 1953 [41]).

La différence entre les bactériophages *perfringens* et les bactériophages des aérobies tient, en premier lieu, aux conditions spéciales dans lesquelles les phages *perfringens* se développent : l'absence d'oxygène libre. On peut supposer que cette différence est déterminée, non pas tant par les particularités des corpuscules que par le fait de leur développement aux dépens des bactéries anaérobies.

Le fait que les souches aérobies de notre collection n'ont jamais été attaquées par un bactériophage *perfringens* serait en faveur de la spécificité de ce dernier. Cette spécificité vis-à-vis de certains groupes de bactéries est caractéristique aussi des phages aérobies.

En ce qui concerne les souches de *Cl. perfringens* (*Welchia perfringens*) choisies pour la recherche de bactériophages actifs, leur ancienneté ne semble pas influencer directement les résultats. Notre collection comporte des souches isolées il y a plus de quarante ans par M. Weinberg et des souches récentes. Par contre, l'origine géographique des souches semble jouer un rôle pour l'isolement des phages *perfringens*. Ainsi, il nous a été impossible de trouver dans les eaux de France le moindre bactériophage actif sur quelques souches provenant d'Europe Centrale.

La sensibilité des souches de *Cl. perfringens* étudiées par nous est en général limitée. Chaque souche est attaquée par un nombre restreint de bactériophages. La souche W, par exemple, n'est sensible qu'à un seul phage de notre collection. D'autre part, toutes nos souches de *Cl. perfringens*, y compris celles d'Europe Centrale, sont lysées sans exception par une substance antagoniste élaborée par un entérocoque et active exclusivement sur *Welchia perfringens* (Guelin, Kreguer et Le Bris, 1947 [5]).

ISOLEMENT DES BACTÉRIOPHAGES ANAÉROBIES.

Les méthodes d'isolement des bactériophages *perfringens* suivent les principes essentiels des méthodes utilisées pour les phages aérobies, bien que la culture bactérienne soit faite selon la technique habituelle pour les anaérobies.

1° 200 cm³ de l'échantillon d'eau dans laquelle on recherche le bactériophage sont mélangés dans une fiole d'Erlenmeyer avec 200 cm³ d'eau peptonée à 3 p. 100, glucosée à 1 p. 1 000.

2° Le mélange est placé au bain-marie à 58° C pendant trente minutes (pour éliminer les germes mésophiles de l'eau).

3° Ensemencement avec une culture très jeune de *Cl. perfringens*, introduite au fond de la fiole. Le mélange contient, après l'ensemencement, 50 millions de germes par centimètre cube. Le départ rapide d'une culture intense inhibe le développement des germes thermorésistants, permettant ainsi l'enrichissement des phages recherchés.

4° Le mélange est placé ensuite à 37° pendant six à huit heures. La croissance des bactéries anaérobies s'effectue dans ces conditions, malgré la présence d'oxygène libre. Anaérobie moins strict que d'autres germes de la gangrène gazeuse, *Cl. perfringens* se multiplie au fond de la fiole, grâce au niveau élevé du liquide dans celle-ci. La culture se développe peu à peu vers le haut.

5° Au bout de six à huit heures, la culture est centrifugée et filtrée. Le chauffage à 60°, couramment utilisé dans le cas des phages aérobies, n'est pas recommandé ici. Les germes thermorésistants de l'eau, non éliminés par le chauffage, auraient le temps d'envahir la surface de la gélose avant la formation des plages (la croissance de *Cl. perfringens* à la surface étant, en général, plus lente que celle des anaérobies facultatifs).

6° Pour l'épreuve du filtrat obtenu, 1 goutte en est déposée à la surface d'une boîte de gélose sur laquelle une suspension bactérienne a été préalablement étalée. Chaque boîte de gélose reçoit 0,25 cm³ d'une culture totale en bouillon (tube de Hall) et 0,1 cm³ d'une solution de glucose à 30 p. 100. Le tout est étalé légèrement et séché pendant quelques minutes à la température du laboratoire. On dépose ensuite le filtrat bactériophagique (il peut également être déposé et étalé en même temps que la culture).

a) La croissance des bactéries est limitée à la surface de la gélose à 1 p. 100 préparée avec de l'eau peptonée à 3 p. 100. Les plages bactériophagiques se forment, nettes et bien dessinées, sur une couche mince et délicate de bactéries. Sur les plaques préparées avec le bouillon Vf, la prolifération bactérienne est tellement intense que, dans la plupart des cas, aucune trace de bactériophage ne se révèle. Parmi les différentes marques de peptone, certaines conviennent mal à l'isolement du bactériophage *perfringens*. La peptone Vaillant, par exemple, donne aussi une culture trop riche, le résultat en est souvent négatif. Nous utilisons habituellement la peptone UCLAF.

Les boîtes de gélose ne doivent pas être trop sèches, car la formation d'une couche bactérienne continue serait compromise dans ce cas. Elles ne doivent pas être trop fraîches non plus, les plages bac-

tériophagiques étant alors confluentes. Nous utilisons habituellement des boîtes de gélose coulées deux jours auparavant et conservées à 37°.

b) L'âge de la culture étalée à la surface de la gélose influence visiblement les résultats. La culture utilisée ne doit pas avoir plus de 24 heures, car une couche continue, sur une plaque peu nutritive, se forme mal avec des cellules âgées. Chez *Cl. perfringens* W, la couche ne se forme qu'à partir d'une culture de quelques heures seulement ; une culture de 24 heures est déjà trop âgée pour permettre la croissance régulière de ces bactéries à la surface (dans les conditions de nos expériences).

7° Les boîtes ensemencées sont placées à 37°, à l'abri de l'oxygène libre. Dans ce but, nous employons, soit un dessiccateur ordinaire, muni d'une rondelle de caoutchouc glycéliné entre les parois et placé à l'étuve ; soit l'appareil de Weinberg et Schneider (absorption de l'oxygène résiduel par le pyrogallol alcalin [12]) ; soit le « Mc Intosh and Fildes anaerobic jar » de chez Gallenkamp (Londres) ; soit, enfin, une étuve à vide construite par Lequeux (Paris).

Le temps entre l'ensemencement des plaques et leur mise en atmosphère confinée doit être réduit au minimum. La couche bactérienne est d'autant plus pauvre que la durée des manipulations est plus longue.

Le bactériophage isolé à partir d'une seule plage est dilué dans 1 cm³ d'eau physiologique. 0,1 cm³ de cette dilution est introduit dans une très jeune culture contenant 50 millions de bactéries par centimètre cube environ. La culture est faite soit en bouillon, soit en eau peptonée à 3 p. 100, glucosée (1 p. 1 000). La température à laquelle la culture se développe ne doit pas dépasser 37° C ; les meilleurs résultats ont été obtenus à 35° C.

Dans les conditions de l'expérience, le bactériophage atteint son titre maximum en quatre-vingt-dix minutes à cent vingt minutes. La filtration des cultures est précédée par une centrifugation, afin d'éliminer le plus gros des bactéries. Les filtrats bactériophagiques se conservent en tubes scellés pendant des mois, voire des années, à la condition d'être préparés en bouillon et non en eau peptonée (dans laquelle le bactériophage disparaît en quelques mois).

EXPÉRIENCES SUR LES ANIMAUX.

Toutes les expériences ont été faites avec la souche *perfringens* W et un bactériophage W, actif sur cette souche.

La souche W (Weinberg) de *Cl. perfringens* (*Welchia perfringens*), la plus toxique de notre collection, a été isolée en 1939 de blessures de guerre. Nous avons cherché à l'introduire en quantité minime, chez le cobaye, pour provoquer chez cet animal un phezmon d'allure progressive, et non une intoxication brutale entraînant la mort rapide.

Le bactériophage *perfringens* W (isolé avec M^{lle} Le Bris) est le seul parmi les plages *perfringens* de notre collection auquel

la souche W soit sensible. Son activité est étroitement spécifique, puisqu'il n'attaque qu'exceptionnellement d'autres souches de *Cl. perfringens* étudiées par nous. Du point de vue morphologique, le bactériophage comporte une tête arrondie de $60 \pm 10 \mu$ de diamètre (mensuration sur les images électroniques) et une queue de $120 \times 15 \mu$, qui se termine par un petit renflement. La taille du bactériophage, déterminée par ultrafiltration, est de $75 \pm 10 \mu$ (Elford, Guelin, Hotchin et Challice, 1953 [3]). Le bactériophage a été isolé dans les eaux de l'égout de Clichy (Paris). Sa présence a été également constatée dans les eaux de la Seine à Epinay, dans celles de la Tamise et dans les eaux côtières de la Méditerranée, à Nice.

Les filtrats bactériophagiques ont toujours été préparés avec de l'eau peptonée et utilisés après quatre semaines seulement, car la toxine de *Cl. perfringens* n'est pas neutralisée par le bactériophage. La préparation des filtrats en bouillon entraînerait, en même temps, l'élaboration d'une forte toxine, susceptible d'intervenir activement au cours de nos expériences.

Les essais de neutralisation de la toxine par le bactériophage ont été faits de la façon suivante :

Des doses décroissantes de toxine fraîche de 18 heures ont été mélangées avec une quantité constante de filtrat bactériophagique contenant 1.10^9 corpuscules phages par centimètre cube. Après un séjour de deux heures à 35° , 1 cm^3 de chaque mélange est introduit, par voie intramusculaire, dans la patte postérieure d'un cobaye. Les cobayes témoins reçoivent les mêmes doses de toxine mélangée à de l'eau peptonée, au lieu des filtrats bactériophagiques. Les résultats obtenus montrent que les doses mortelles ont été les mêmes dans les deux groupes. Le bactériophage n'a pas neutralisé l'activité de la toxine.

Les 28 cobayes (de 350-400 g) utilisés dans notre expérience ont été divisés en deux groupes : 14 cobayes témoins injectés avec les bactéries seules et 14 cobayes injectés avec des bactéries ayant préalablement fixé le bactériophage.

1° Trois tubes de Hall, contenant de l'eau peptonée glucosée (1:1 000) sont ensemencés avec une culture de six heures de *Cl. perfringens* W.

2° Les tubes sont placés à 37° pendant le temps nécessaire à la formation d'une jeune culture (dans la moitié inférieure du tube seulement).

3° Les trois cultures sont réunies et additionnées de 20 cm^3 d'eau physiologique.

4° Centrifugation pendant quinze minutes ; les bactéries sont ainsi lavées deux fois.

5° Le culot est repris avec 14 cm³ d'eau physiologique et divisé en deux parties.

6° Une partie reçoit 3,5 cm³ de filtrat bactériophagique ; l'autre, témoin, 3,5 cm³ d'eau peptonée.

7° Séjour à 20° pendant 100 minutes (pour la fixation des corpuscules sur les cellules bactériennes).

8° Centrifugation pendant quinze minutes, après avoir ajouté 30 cm³ d'eau physiologique à chacune des deux suspensions bactériennes (pour éliminer, dans un tube, les corpuscules phages non fixés).

9° Les deux culots sont repris avec 6 cm³ d'eau chacun.

10° Injection intramusculaire de 0,3 cm³ dans la patte postérieure des cobayes.

Le nombre total de germes avant l'inoculation aux cobayes (déterminé au microscope à l'aide d'une cellule compte-bactéries) a été de 26 000 000 par centimètre cube. Le nombre de germes susceptibles de se multiplier a été révélé par les titrages en gélose profonde. Nous avons ainsi obtenu 13 000 000 pour les bactéries témoins et 5 000 000 pour les bactéries contaminées par le bactériophage.

La quantité de bactériophages, avant l'inoculation au cobaye, a été de 100 millions de corpuscules par centimètre cube. La proportion des corpuscules fixés a été de 97 p. 100.

Il en résulte que, pour chaque centimètre cube de suspension bactérienne injecté aux cobayes, 100 millions environ de corpuscules phages ont été fixés sur 26 000 000 de germes. La moitié des bactéries a été incapable de se reproduire et une partie des corpuscules fixés sur ces bactéries a été ainsi perdue pour l'expérience. D'après les résultats des titrages en gélose profonde, sur 13 000 000 de bactéries vivantes ayant fixé le bactériophage, 62 p. 100 ont été éliminées, soit que leur reproduction ait été empêchée par suite d'une fixation du bactériophage, soit qu'elles aient été, au cours de leur croissance, atteintes par le bactériophage développé en même temps. Au moment de l'inoculation, il y avait donc 38 p. 100 des bactéries (soit 5 000 000 par centimètre cube) capables de se reproduire et de former des colonies, malgré la présence de bactériophage.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES.

Les cobayes témoins, injectés avec les bactéries sans phages, présentent le lendemain les symptômes classiques de la gangrène gazeuse. Ils sont immobiles, le poil hérissé. Au point d'inoculation, un œdème mou, crépitant, s'étend de plus en plus, immobilisant la patte, et, chez les 12 cobayes, envahissant la paroi abdominale. La peau est décollée et humectée par un exsudat rosâtre, qui forme une poche flasque.

Dix jours après, 5 cobayes sur les 14 inoculés restent vivants : 2 présentent un œdème limité, situé dans la région de la cuisse ; les 3 autres ont encore de gros œdèmes diffus ; 9 sur 14 ont succombé en quatre et cinq jours. A l'autopsie, les organes parenchymateux sont congestionnés, le foie est nécrotique. *Cl. perfringens* a été isolé du sang.

Par contre, aucun des 14 cobayes inoculés avec des bactéries ayant préalablement fixé le bactériophage n'a présenté de symptômes morbides. Les petits nodules constatés au point d'injection chez 6 cobayes ont disparu le lendemain. Le processus pathologique a été arrêté dès le début.

La toxine de *Cl. perfringens* W n'a pas été neutralisée par la présence du filtrat bactériophagique actif sur cette souche. Ceci confirme nos observations antérieures, faites avec Kreguer en 1950 [6]. La production de toxine par une culture contaminée (*Cl. perfringens* 80 b) a suivi son cours habituel, malgré l'élévation du titre bactériophagique. L'effet protecteur du bactériophage observé dans nos dernières expériences peut s'expliquer uniquement par son action antibactérienne. Dans la pathologie des infections à *Cl. perfringens*, la phagothérapie apparaît donc comme un traitement complémentaire, dirigé exclusivement contre les bactéries, et non contre la toxine.

Les résultats exposés permettent d'envisager sous un angle favorable l'avenir du traitement par le bactériophage *perfringens*. Nos recherches actuelles ne concernent que le moment où les bactéries ont déjà fixé le bactériophage (les conditions de cette fixation *in vivo* nécessitent d'autres études). Dès ce moment l'évolution du processus pathologique chez nos cobayes a complètement avorté. Si 62 p. 100 des bactéries ayant fixé le bactériophage ont été éliminées dès le début, 38 p. 100, par contre, sont restées parfaitement viables. Introduites chez le cobaye, ces bactéries n'ont pas pu se reproduire. Le bactériophage, dont le titre s'est élevé au fur et à mesure de leur croissance, devait avoir contribué à la défense de l'organisme contre l'agent pathogène.

RÉSUMÉ.

1° La méthode d'isolement et d'entretien des bactériophages anaérobies est décrite.

L'effet du bactériophage *perfringens* est étudié au cours d'une infection expérimentale du cobaye, provoquée par *Cl. perfringens* (*Welchia perfringens*) type A.

2° La toxine de *Cl. perfringens* W n'est pas neutralisée par le filtrat bactériophagique, actif sur cette souche.

3° L'évolution d'un phlegmon gangréneux chez le cobaye a

avorté, du fait de la fixation préalable du bactériophage sur les bactéries.

Toutes les manipulations avec les bactériophages anaérobies ont été mise au point avec M^{lle} Le Bris (actuellement M^{me} Godzawa-Godlewski). Plusieurs bactériophages *perfringens* ont été isolés par elle. Nous la remercions très sincèrement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. N. ASHESHOV, STRELITZ et HALL. *Antibiot. Chemoth.*, 1952, **7**, 366.
- [2] C. COWLES. *J. Bact.*, 1934, **27**, 163.
- [3] W. J. ELFord, A. M. GUELIN, J. E. HOTCHIN et C. E. CHALLICE. *Ces Annales*, 1953, **84**, 319.
- [4] S. M. FRID. In *Traité de Bactériologie médicale*, Medguiz, 1945, p. 84.
- [5] A. GUELIN, A. KREGUER et J. LE BRIS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1036.
- [6] A. GUELIN et A. KREGUER. *Ces Annales*, 1950, **78**, 532.
- [6 bis] A. GHELIN et P. LÉPINE. *Ces Annales* (sous presse).
- [7] P. HAUDUROY. *La Presse Médicale*, 1946, n° 51, 703.
- [8] F. d'HÉRELLE. *Phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses*, Masson, édit., Paris, 1938.
- [9] P. M. JOURAVLEV, G. A. KOKINE et M. P. POKROWSKAJA. *J. Microb., Epidem. Immunol.*, 1944, n° 9, 44.
- [10] A. KREGUER, A. GUELIN et J. LE BRIS. *Ces Annales*, 1947, **73**, 1038.
- [11] C. LEVADITI, A. GUELIN et A. VAISMAN. *Rev. Immunol.*, 1953, **47**, 324.
- [12] M. WEINBERG, R. NATIVELLE et A. PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, Masson, édit., Paris, 1937, p. 21.

**ACTION DE LA NYSTATINE (FUNGICIDINE)
IN VITRO ET IN VIVO SUR CANDIDA ALBICANS
ET AUTRES CHAMPIGNONS LEVURIFORMES**

par E. DROUHET (*).

(Institut Pasteur,
Service de Mycologie et de Physiologie végétale.)

La fréquence et la gravité des manifestations pathologiques dues aux champignons levuriformes du genre *Candida* et en particulier *C. albicans* ont augmenté considérablement depuis quelques années [3, 9, 11, 16, 28]. En France, Lelong et coll. [14] et récemment Debré et coll. [3] signalent des cas mortels de muguet généralisé chez des nourrissons; certains cas, même, sont signalés chez l'adulte [4].

Les antibiotiques antibactériens à large spectre, utilisés à hautes doses, sont considérés comme favorisant la pullulation des *Candida* sur les muqueuses [9, 11, 14, 16, 19, 26, 28].

La fréquence et la gravité des manifestations pathologiques attribuées aux infections mycosiques ont rendu nécessaire la recherche de produits actifs et particulièrement d'antibiotiques antifongiques [13, 27]. Parmi ceux qui ont été étudiés la fungicidine se montre particulièrement intéressante. La fungicidine fut découverte par Hazen et Brown en 1950 [10] dans un extrait mycélien de *Streptomyces noursei*, aux Laboratoires de recherches du New York State Department of Health, d'où le nom ultérieur de nystatine qu'ils ont donné à cet antibiotique [2]. La nystatine est active *in vitro* sur différentes espèces de *Candida*, ainsi que sur d'autres champignons levuriformes ou filamenteux pathogènes ou non, mais elle n'a aucune action sur les bactéries. Les propriétés physiques, chimiques et biologiques distinguent cet antibiotique des autres antibiotiques connus [7]. *In vivo*, Brown, Hazen et Mason [2] et ensuite Sternberg et coll. [26] ont montré que la nystatine a une activité thérapeutique remarquable dans l'infection expérimentale provoquée par *C. albicans* chez la souris.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 novembre 1954.

Les recherches préliminaires que nous avons entreprises dès janvier 1954, tant *in vitro* qu'*in vivo*, ont confirmé : 1° l'activité de la nystatine comme antifongique envers *Candida* ; 2° l'absence totale de toxicité aux doses thérapeutiques ; ces recherches ont ainsi permis d'envisager son application pratique dans des cas graves de muguet chez de jeunes enfants menacés d'une généralisation ou même présentant cette généralisation.

Les résultats favorables des premières applications cliniques sont obtenus et présentés à la Société de Pédiatrie par R. Debré, P. Mozziconacci, E. Drouhet, V. Drouhet et A. Hoppeler [3] et confirmés par M. Lelong et coll. [45] (1). Ultérieurement de nombreux pédiatres et médecins des Hôpitaux de Paris et de province éprouvent l'activité thérapeutique de cet antibiotique. Dans tous ces cas l'étude mycologique nous a été confiée et nous avons ainsi suivi, par de nombreux contrôles mycologiques, l'activité de cet antibiotique dans les infections humaines.

I. — Action *in vitro* de la nystatine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Les lots de nystatine [Mycostatine Squibb] (2) étudiés sont le lot HA-337-A titrant initialement 1 400 unités (3) par milligramme de poudre lyophilisée et le lot HL-99-E titrant 2 045 unités par milligramme. La poudre est dissoute dans une solution de tampon phosphaté à pH 7, contenant 70 p. 100 d'alcool éthylique. La concentration initiale est de 1 mg par centimètre cube, ce qui donne une très fine suspension homogène. Les dilutions suivantes sont faites dans des solutions tampon à partir de la suspension initiale : 500 ; 250 ; 125 ; 62,5 ; 31,25 ; 15,62 μ g par centimètre cube.

Milieux. — La formule de Sabouraud n'a pu être utilisée pour le dosage de la nystatine. L'acidité et la présence d'impuretés diminuent la sensibilité de l'antibiotique. Nous avons donc utilisé le milieu suivant : asparagine, 1 g ; glucose, 20 g ; PO_4HNa_2 , 12 H_2O , 3,34 g ; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,54 g ; SO_4Mg , 7 H_2O , 0,50 g ; solution de Berthelot d'oligo-éléments, X gouttes ; thiamine, 10^{-6} ; acide nicotinique, 10^{-6} ; pantothénate de Ca, 10^{-6} ; pyridoxine, 10^{-6} ; biotine, 10^{-8} . Le pH de ce milieu est neutre ; les essais préliminaires ont montré que les pH plus acides réduisent l'activité de l'antibiotique.

(1) Nous remercions vivement MM. les professeurs R. Debré et M. Lelong, qui ont bien voulu nous confier l'étude mycologique des premiers cas de muguet traités par cet antibiotique et nous encourager dans nos recherches.

(2) Nous remercions vivement le Squibb Institute for Medical Research (Dr Philippe Eloy) qui a mis à notre disposition ces lots de nystatine.

(3) Une unité de nystatine est la plus petite quantité d'antibiotique qui inhibe complètement la croissance d'une souche test de *Saccharomyces cerevisiae* dans 1 cm^3 de bouillon. Cette souche est deux fois plus sensible que *C. albicans*.

Pour l'étude en milieu liquide, le milieu est réparti en tubes de 17 x 170 mm à raison de 9 cm³ par tube ; pour l'étude sur milieu solide, le milieu gélosé à 18 p. 1 000 est réparti en fioles de Legroux à raison de 18 cm³ par fiole.

Après autoclavage on ajoute dans chaque tube de milieu liquide 1 cm³ de nystatine à la concentration voulue, ainsi que de la pénicilline (100 U. O. par centimètre cube) et de la streptomycine (200 µg par centimètre cube) afin d'éviter une contamination bactérienne. Pour le milieu solide, ce sont 2 cm³ de nystatine qui sont ajoutés et la même concentration de pénicilline et de streptomycine.

La méthode des disques de papier imprégnés de nystatine est également appliquée, mais la sensibilité est assez faible avec cette méthode. Seuls des disques imprégnés à des concentrations supérieures à 100 µg sont entourés d'une nette zone d'inhibition. A partir de cultures jeunes de 1-2 jours on ensemence une suspension de levures (1 anse pour 5 cm³ d'eau physiologique) : 1 goutte pour le milieu liquide et un trait de pipette à la surface de la gélose pour les milieux solides ; sur une boîte de Legroux les traits d'ensemencement sont distants de 1 cm et on peut ainsi ensemençer 10 souches par boîte. Les milieux solides doivent être ensemençés dans les deux jours qui suivent l'addition de l'antibiotique du fait de la diminution de l'activité de ce dernier dans le milieu.

RÉSULTATS.

a) *Action fungistatique.* — Etudiant comparativement la sensibilité à la nystatine de différentes espèces de champignons levuriformes, on constate que cette sensibilité est deux à trois fois plus grande en milieu liquide qu'en milieu gélosé. Parmi les trois genres de champignons levuriformes étudiés, *Saccharomyces* est le plus sensible, suivi de *Candida* et ensuite de *Geotrichum*. Ainsi on constate d'après les résultats résumés dans le tableau I que pendant quarante-huit heures la croissance de *S. cerevisiae* s. BRE est complètement inhibée par 1,56 µg de nystatine par centimètre cube, celle de *C. albicans* s. MIC et de *C. pseudotropicalis* s. 223 par 3,12 µg et celle de *Geotrichum* s. MAR et s. LAC par 6,25 µg. Ces concentrations sont fungistatiques pendant quarante-huit heures, une croissance ultérieure est constatée après huit jours de culture (tableau I).

En milieu gélosé, la sensibilité à la nystatine est deux à trois fois plus réduite. Toutefois pour des commodités de dosage toutes les souches isolées des prélèvements pathologiques des cas étudiés plus bas, ainsi que de nombreuses autres souches de *Candida* pathogènes, ont été éprouvées sur le milieu gélosé. Les chiffres de sensibilité *in vitro* mentionnés dans le tableau II représentent les résultats obtenus en milieu synthétique gélosé. Au cours du traitement la sensibilité des souches à la nystatine ne s'est pas modifiée. Il en est de même dans les cas de récurrence.

D'après les données obtenues *in vitro* sur milieu gélosé, la concentration moyenne fongistatique pour vingt-quatre à quarante-huit heures de culture est de 6,25 µg par centimètre cube, les extrêmes étant 3,12 et 12,5 µg.

L'addition d'antibiotiques antibactériens comme l'auréomycine, le chloramphénicol, la terramycine, la streptomycine et la pénicilline n'a aucune action sur la croissance des *Candida* et des *Geotrichum*, en présence ou en l'absence de nystatine.

TABLEAU I. — Action de la nystatine en milieu liquide sur *Candida*, *Geotrichum* et *Saccharomyces*.

SOUCHES ETUDIÉES	TEMPS	µg de nystatine (§) par cm ³ de milieu							
		0	0,76	1,56	3,12	6,25	12,5	25	
<u>C.albicans</u> s. MIC.	24 h.	50	5	4	0	0	0	0	
	48 h.	62	18	8	0	0	0	0	
	190 h.	155	136	116	48	14	0	0	
<u>C.pseudo-tropicalis</u> s.223 IP	24 h.	38	32	7	0	0	0	0	
	48 h.	90	51	12	0	0	0	0	
	190 h.	180	155	152	128	9	0	0	
<u>Geotrichum</u> sp. s.LAC.	24 h.	11	9	3	2	0	0	0	
	48 h.	24	21	8	4	0	0	0	
	190 h.	Culture mycélienne abondante (§§)							
<u>Geotrichum</u> sp. s.MAR.	24 h.	14	5	3	1	0	0	0	
	48 h.	22	6	4	2	0	0	0	
	190 h.	Culture mycélienne abondante							
<u>S.cerevisiae</u> s.BRE.	24 h.	48	10	0	0	0	0	0	
	48 h.	123	10	0	0	0	0	0	
	190 h.	130	95	76	55	0	0	0	
(§) Lot HL-162-G. Les chiffres indiquent les divisions néphélométriques (photomètre Meunier) obtenues avec une dilution 1/5 des cultures. (§§) Evaluation néphélométrique impossible.									

L'addition de sérum ou de sang de cheval n'influence pas non plus la sensibilité à la nystatine des *Candida* et des *Geotrichum*.

b) *Action fongicide*. — La nystatine n'a pas seulement une action fongistatique mais également une action fongicide que l'on détermine de la façon suivante : une suspension de *C. albicans* dans de l'eau physiologique (environ 3 000 000 000 de cellules vivantes par centimètre cube) est mise en présence de 100 et 1 000 µg de nystatine par centimètre cube. Après des temps variables on évalue le nombre de cellules restées vivantes par la méthode classique de l'étalement en plaques en prenant la précaution de laver trois fois les levures avant leur étalement.

Après cinq heures de contact avec 1 000 µg de nystatine, toutes les levures sont tuées ; après le même temps de contact avec

100 μ g d'antibiotique le nombre de cellules vivantes tombe de 3 000 000 000 à 146 000 000 ; après vingt heures de contact, il n'y a plus aucune levure vivante (fig. 1).

II. — Action de la nystatine *in vivo*.

1° CHEZ LE LAPIN.

Nous avons choisi le lapin comme animal d'expérience du fait de sa sensibilité extrême à l'infection à *C. albicans*. Seuls jusqu'à

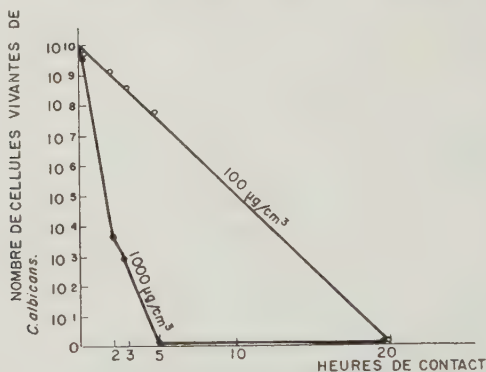


FIG. 1. — Action fongicide de la nystatine sur *C. albicans*, souche MIC.

présent la souris et le rat ont fait l'objet de travaux concernant l'action de la nystatine [10, 26].

a) TOXICITÉ. — Des lapins pesant en moyenne 2 000 g sont soumis à l'administration intrastomacale des doses suivantes de nystatine (mycostatine lot St 695) à raison de 1,20, 2,40, 3,60, 4,80 et 6 g pour les vingt-quatre heures que dure l'expérience. Aucun effet toxique n'est constaté. La dose toxique située par Hazen autour de 4 g par kilogramme n'a pas été atteinte dans nos expériences, étant donné la quantité limitée d'antibiotique dont nous disposions.

Par voie intraveineuse ou sous-cutanée, 25 mg de nystatine par kilogramme ne provoquent pas de signes généraux de toxicité ; aucune irritation locale n'est constatée au point d'injection. L'injection intraveineuse doit être faite très lentement pour éviter un état de choc qui d'ailleurs disparaît rapidement.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur la souris et le rat et montrent la faible toxicité de cet antibiotique, ce qui le distingue de la plupart des autres antibiotiques antifongiques, trop toxiques pour être employés en thérapeutique.

b) ACTION SUR L'INFECTION EXPÉRIMENTALE DU LAPIN. — Voie intraveineuse. — Toutes les souches de *C. albicans*, inoculées par voie intraveineuse, provoquent chez le lapin une infection mortelle en cinq à sept jours. Deux souches de *C. albicans* (souche MIC et souche GUE) ont été étudiées avec des résultats semblables.

Plusieurs lots de lapins pesant environ 2 kg ont été inoculés par voie intraveineuse avec 2 cm³ d'une suspension de levures contenant 250 000 000 d'éléments par centimètre cube et provenant de cultures jeunes de 24-48 heures sur le milieu de Sabouraud.

L'administration par voie buccale de 100 mg par kilogramme de nystatine n'a pu enrayer la marche fatale de l'infection par voie intraveineuse. L'action de doses supérieures est en cours d'étude.

Le traitement parentéral effectué après quelques essais préliminaires a été appliqué de la façon suivante à des lapins inoculés uniformément :

1° Lapins traités le premier jour par 10 mg de nystatine intraveineuse deux heures avant et deux heures après l'inoculation des *Candida* ; ensuite pendant trois jours deux fois 10 mg par jour par voie intraveineuse.

2° Lapins traités le premier jour comme les précédents mais recevant les trois jours suivants deux injections de 10 mg par voie sous-cutanée.

3° Lapins traités le premier jour, une heure avant l'inoculation, par 10 mg de nystatine par voie veineuse et 10 mg par voie sous-cutanée ; puis, quatre heures après l'inoculation, injection des mêmes doses par les mêmes voies (total : 40 mg). Les trois jours suivants les lapins ont reçu le même traitement que le premier jour.

4° Lapins traités le premier jour une heure avant l'inoculation avec 20 mg de nystatine par voie sous-cutanée, puis quatre heures après l'inoculation, injection sous-cutanée de 20 mg. Les trois jours suivants, les lapins reçoivent deux fois 20 mg par voie sous-cutanée.

5° Lapins inoculés mais non traités.

Les témoins non traités sont tous morts entre le cinquième et le septième jour. Pour les lots 1 et 2, 2 lapins seulement sur 8 ont survécu plus de trois semaines, mais présentaient des signes de paralysie chronique, tandis que pour les lots 3 et 4, 3 lapins sur 8 ont survécu pendant plus d'un mois ; certains présentaient un léger torticolis montrant ainsi la cicatrice d'un foyer cérébral guéri.

Ces expériences prouvent que la nystatine diminue le taux de mortalité de l'infection expérimentale à *C. albicans* ; une telle

diminution n'a jusqu'à présent jamais été obtenue avec aucun des fongicides connus [22]. Les doses thérapeutiques ne sont toutefois pas atteintes dans ces expériences.

Voie digestive. — L'infection expérimentale par voie intraveineuse ne correspond pas à l'infection rencontrée en clinique humaine ; dans ce dernier cas la porte d'entrée est la bouche et la localisation la plus fréquente est le tractus digestif.

Nous avons donc inoculé les lapins par voie digestive : 5 cm³ d'une suspension contenant 5 000 000 de levures sont introduits dans l'estomac à l'aide d'une sonde. Les excréments des

TABLEAU II. — Sensibilité à la nystatine de différentes souches de *Candida* et *Geotrichum* en milieu gélosé.

ESPECES	NOMBRE DE SOUCHES ETUDIEES	NYSTATINE conc.min.en µg /cm ³ (§)
<u>C.albicans</u>	3	3,12
	28	6,25
	4	12,5
<u>C.pseudo-tropicalis</u>	3	6,25
	6	12,5
<u>C.tropicalis</u>	4	6,25
<u>C.parakrusei</u>	5	12,5
<u>C.krusei</u>	2	12,5
<u>Geotrichum</u> sp.	2	6,25
	3	12,5
(§) La concentration indiquée est celle qui produit une inhibition complète pendant 46 heures de culture à 30°.		

lapins expérimentés, examinés à plusieurs reprises avant l'inoculation, ne présentent pas de *Candida*.

Trois lots de lapins sont constitués, chaque lapin pesant environ 2 kg. Les lapins subissent pendant les quatre premiers jours une inoculation quotidienne de *C. albicans*. Un lot sert de témoin. Un deuxième lot reçoit en même temps que la quatrième inoculation et chacun des jours suivants 100 mg d'auréomycine intrastomacale. Pour le troisième lot la nystatine (mycostatine lot St. 695-11-C-1) remplace l'auréomycine.

La recherche de *Candida* est faite sur des excréments recueillis en général matin et soir. Environ 500 mg de matières fécales sont dilacérés et maintenus dans de l'eau physiologique contenant de la pénicilline (1 000 U. O. par centimètre cube), de la streptomycine (1 000 µg par centimètre cube) et de l'auréomycine (100 µg par centimètre cube). Des dilutions successives sont mélangées à la gélose de Sabouraud additionnée des mêmes anti-

biotiques (concentrations environ dix fois plus faibles) ; la gélose est coulée dans des boîtes de Petri.

RÉSULTATS. — Cette expérience préliminaire résumée dans la

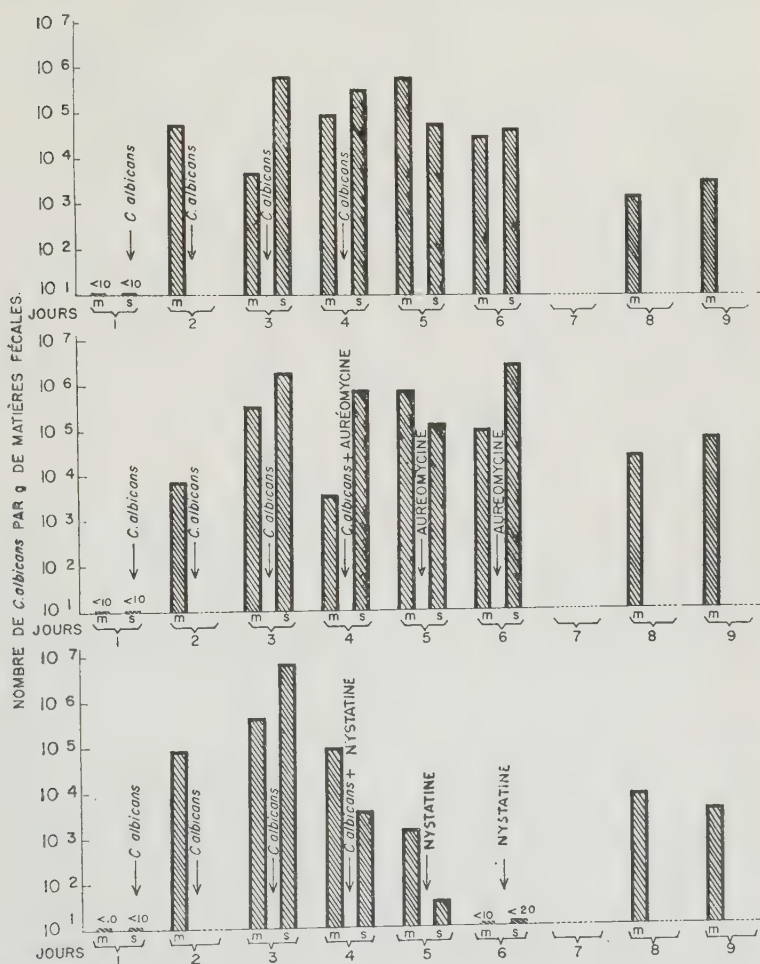


FIG. 2. — Action de la nystatine sur la flore intestinale à *C. albicans* chez le lapin infecté par voie intrastomacale. Chaque colonne représente la moyenne du chiffre obtenu sur 3 lapins, m = matin, s = soir.

figure 2 montre l'action remarquable de la nystatine sur la stérilisation de la flore mycologique de l'intestin. L'administration pendant trois jours de 50 mg par kilogramme par voie diges-

tive amène une réduction considérable du nombre de levures des matières fécales du lapin. Ce nombre est réduit de quelques millions à quelques levures par gramme de matières fécales. L'administration de doses trop faibles d'antibiotique dans cette expérience a amené une reprise du développement des levures.

L'auréomycine, dans les conditions particulières de cette expérience, n'a pas augmenté considérablement le développement des *Candida* dans les tissus.

2° INFECTIONS HUMAINES A « CANDIDA ».

L'efficacité de la nystatine *in vitro* et sur l'infection expérimentale à *C. albicans*, son absence de toxicité par voie buccale ont permis d'envisager le traitement par cet antibiotique en clinique humaine. Les premières applications ont été faites chez des nourrissons atteints gravement de muguet généralisé ou en voie de généralisation. Les résultats cliniques obtenus chez des nourrissons et enfants par R. Debré, P. Mozziconacci, E. Drouhet, V. Drouhet et A. Hoppeler [3], par M. Lelong, Satgé et Drouhet [15] ont montré l'action efficace de cet antibiotique. Ces résultats ont permis l'application clinique dans de nombreux autres cas chez des enfants et adultes. Dernièrement, J. Bernard, G. Mathé et E. Drouhet ont signalé les résultats favorables du traitement par la nystatine sur les infections à *Candida* au cours des hémopathies décompensées [4].

Dans tous ces cas l'étude mycologique nous a été confiée et nous donnons ci-dessous les résultats préliminaires obtenus sur 35 cas de manifestations pathologiques dues à *C. albicans*. Dans certains de ces cas l'association avec *Geotrichum* a été notée.

EXAMENS DE LABORATOIRE. — La recherche de levures dans les prélèvements pathologiques est effectuée de façon systématique dans les prélèvements de gorge, de selles, d'urines, de pus d'abcès ou de sang afin de déterminer s'il s'agit d'une levurose généralisée ou localisée.

Les examens mycologiques sont effectués avant le traitement (quelquefois à plusieurs reprises), puis après quatre à cinq jours de traitement, puis souvent quelques jours après l'arrêt de celui-ci.

Isolement. — Les produits pathologiques sont ensemencés sur le milieu de Sabouraud additionné au moment de l'emploi de 50 U. O. de pénicilline et 100 µg de streptomycine par centimètre cube de milieu afin d'éviter le développement des bactéries. Pour les selles on ajoute 0,1 mg d'auréomycine par centimètre cube de

milieu. L'ensemencement est fait par étalement à la surface de la gélose du contenu de l'écouvillon pour les prélèvements de gorge, du contenu d'une anse de platine pour les matières fécales et de II gouttes de sédiment pour les urines ; 4 tubes sont ensemencés pour chaque prélèvement. L'hémoculture est faite sur le milieu liquide de Sabouraud avec 2 cm³ de sang pour 8 cm³ de milieu.

Identification. — Pour les *Candida* les méthodes et les techniques d'identification utilisées sont celles employées couramment dans le Service de Mycologie de l'Institut Pasteur et décrites récemment [5]. Pratiquement, l'obtention de chlamydospores caractéristiques de *Candida albicans* sur le milieu gélosé pomme de terre-carotte ou sur le milieu au riz, nous a dispensé de chercher les autres caractères de détermination. Pour les *Geotrichum*, les caractères morphologiques ont suffi pour faire le diagnostic du genre.

Sensibilité à la nystatine. — Elle est recherchée suivant le procédé décrit dans le premier chapitre.

TRAITEMENT ANTIFONGIQUE.

Les lots de nystatine utilisés pour le traitement de la plupart des cas ont été le lot de mycostatine HA-337 titrant 1 400 unités par milligramme de poudre et le lot St-695 titrant environ 2 000 unités par milligramme de poudre. Dans quelques cas, différents autres lots ont été utilisés avec des résultats semblables. Les doses varient de 200 mg à 1 g par jour pendant quatre à cinq jours.

En général, les doses de l'antibiotique administré par voie buccale et mélangé à la nourriture sont, pour les enfants ne dépassant pas 5 kg, de 100-200 mg par kilogramme de poids le premier jour, et 100 mg les trois ou quatre jours suivants, selon le contrôle du laboratoire et l'évolution clinique. Dans tous les cas on ne dépasse pas les doses totales : 1 g le premier jour et 0,5 g les jours suivants. Les doses sont toujours parfaitement tolérées, bien que certains malades présentent un état général particulièrement grave. Les derniers lots expérimentés ayant une activité plus importante ($> 2\,000$ unités par milligramme) les doses utilisées sont réduites. Le contact le plus prolongé possible de la poudre de nystatine avec les lésions de muguet buccal se montre d'une efficacité remarquable.

RÉSULTATS. — Dans le tableau III sont résumés les résultats des examens de laboratoire et les renseignements cliniques de 13 cas de muguet généralisé, dont 3 avec hémoculture positive à *C. albicans* et 3 avec des abcès cutanés, tous traités par la nystatine. Dans

le tableau IV sont résumées les données sur 12 autres cas d'infections localisées à *C. albicans* (4).

TABLEAU III. — Action de la nystatine sur les infections généralisées à *Candida albicans*.

MALADE ÂGE POIDS	MALADIE PRIMITIVE ANTIBIOTIQUES AVANT MYCOSE	FORME DE MONILIE	MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES FONGIQUES	AVANT TRAITEMENT						TRAITEMENT ANTIFONGIQUE (NYSTATINE)		APRÈS TRAITEMENT						ÉVOLUTION CLINIQUE DE LA MYCOSE	
				DATES	LEVURES DANS LES PRÉLEVEMENTS				IDENTIFI- CATION	SENSIBILITÉ NYSTATINE	DOSE JOURNAL- EN g.	DURÉE EN JOURS	DATES	LEVURES DANS LES PRÉLEVEMENTS					
					GORGE	SELLES	URINES	SANG						ABCS	GORGE	SELLES	URINES		SANG
1 Aka... 8 ans 30 kg	Leucose Pén. St. Au. Ery.	DIGESTIVE ET URINAIRE ET ABCES CUTANÉS	Muguet... Vulvite	1 V 954	+	+	+	+	<i>C. albic</i>	6,25µg	0,8 0,8	4 8	4 V 8 V	+	+	0	0	GUÉRISON 3 JOURS	
2 Mat... 2 ans 7400g	Staphylococcie Pén. Ery. Au. Ter.		Muguet	4. III	+	+	+	+	<i>C. albic</i>	6,25µg	0,7	3	8. III	0	0	0	0	GUÉRISON 24 HEURE	
3 Alt... 6 sem 4000g	Staphylococcie Pén. St. Chi. Ter. Mag. Neo		Muguet Absces fessier Chute de poids	26. II I. III	+	+	+	+	<i>C. albic</i>	6,25µg	1 0,5	1 3	5. III	0	0	0	0	GUÉRISON 4 JOURS	
4 Gué... 1 an 1/2 8000g	Staphylococcie Pén. St. Chi.		Muguet. Diarrhée Absces fessier. Toxicose	4. II	+	+	+	0	<i>C. albic</i>	3,12µg	0,8	4	9. II	0	0	0	0	GUÉRISON 3 JOURS	
5 Mol... 18 mois 10 kg	Staphylococcie Pén. St. Ter. Chi.		Muguet... Vulvite Absces pleural Eruption cutanée	10. VI	+	+	+	+	<i>C. albic</i>	6,25µg	1 0,5	1 4	16. VI	0	0	0	0	GUÉRISON R RÉCIDIVE APRÈS 15 JOURS	
6 Mic... 5 mois 5700 g	Oto-pharyngite Pén. St. Chi. Ter.		Muguet Diarrhée Hématurie	24. IV	+	+	+		<i>C. albic</i>	6,25µg	0,5 0,5	4 4	28. IV 3. V	+	0	0	0	GUÉRISON 4 JOURS	
7 Lue... 4 mois 5200 g	Absces (<i>S. aureus</i>) Streptococcie Pén. St. Chi.		Muguet	8. VI	+	+	+		<i>C. albic</i>	6,25µg	0,5	2	13. VI	0	0	0		GUÉRISON R	
8 Pau... 16 mois	Toxicose Pén. St.		Muguet Eruption cutanée Fièvre	4. VI	+	+	+		<i>C. albic</i>	6,25µg	0,3	5	19. VI	0	0	0		GUÉRISON R	
9 Sol... 3 mois 4200g	Toxicose		Muguet Fièvre Diarrhée	2. X	+	+	+		<i>C. albic</i>	6,25µg	0,4 0,2	3 3	3. X 4. X 6. X	0 0 0	+	0	0	GUÉRISON R	
10 Acq... 10 ans 30 kg	Leucose Au. Ter.		Muguet	22. VI	+	+	+		<i>C. albic</i>	10 µg	0,5	2						AMÉLIORATION AVANT EXPIRATION	
11 Gué... 7 ans 19 kg	Staphylococcie Pén. St. Au. Chi. Neo Ery.		Troubles digestifs	11. IX	+	+	+		<i>C. albic</i> <i>Geotrich</i> (selles)	6,25µg	0,5 1	3 3	14. IX	+	+	0	0	GUÉRISON	
12 Mue... 35 ans 44 kg	Leucose Pén. St. Au.		Muguet	6. VI	+	+	+		<i>C. albic</i>	6,25µg	0,5	5	11. VI	0	+	0		GUÉRISON 24 HEURE	
13 Lac...	Leucémie myéloïde Pén. St.	Muguet Dysphagie Diarrhée	25. IX 27. IX	+	+	+	0	<i>C. albic</i> <i>Geotrich</i> (selles)	6,25µg 12,5 µg	0,5 1	3 3	2. X 26. X	+	+	0 <i>Geotrich</i> 0	0 0	GUÉRISON 4 JOURS		

(4) Les examens de laboratoire mentionnés dans ces deux tableaux proviennent de malades hospitalisés dans les services hospitaliers suivants : service du professeur Debré (Hôpital des Enfants-Malades) : cas 3, 4, 14, 15, 16 ; service du professeur Lelong (Hôpital Saint-Vincent de Paul) : cas 2, 4, 8 ; service du professeur J. Bernard (Hôpital des Enfants-Malades) : cas 1, 10, 12, 13, 24, 25 ; service du professeur Lamy (Hôpital des Enfants-Malades) : cas 9 ; service du professeur Lévy-Solal (Hôpital Baudelocque) : cas 18 ; service du professeur Cathala (Hôpital Trousseau) : cas 19 ; service du Dr Bertrand (Hôpital de Saint-Germain) : cas 6 ; service du Dr Clément (Hôpital Bretonneau) : cas 7 et 20 ; service du Dr Rossier (Ecole de Puériculture) : cas 21, 22 et 23 ; service du Dr Seringe (Hôpital de Bicêtre) : cas 5.

D'après ces données on remarque que l'administration de la nystatine pendant quatre ou cinq jours est suivie de la dispari-

TABLEAU IV. — Action de la nystatine sur les infections à *C. albicans* localisées à la muqueuse digestive.

MALADIE PRIMITIVE	MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES FONGIQUES	AVANT TRAITEMENT						TRAITEMENT ANTIFONGIQUE (NYSTATINE)		APRÈS TRAITEMENT						
		DATES	LEVURES DANS LES PRÉLEVEMENTS				IDENTIFI- CATION	SENSIBILITÉ NYSTATINE	DOSE JOURNAL. EN g	DURÉE EN JOURS	DATES	LEVURES DANS LES PRÉLEVEMENTS				ÉVOLUTION CLINIQUE DE LA MYCOSE
			GORGE	SELLES	URINES	SANG						GORGE	SELLES	URINES	SANG	
ANTIBIOTIQUES AVANT MYCOSE																
Méningite Pén. St. Chl. Sulf.	Muguet. Dysphagie	28.II 1954	+	+	0		<i>C. albic</i>	6,25µg	1 0,5	1 3	4.III	0	0	0		GUÉRISON EN 3 JOURS
Broncho-pneumonie Pén. St. Chl.	Muguet Troubles digestifs Chutes de poids	4.III	+	+	0	0	<i>C. albic</i>	6,25µg	1 0,5	4 4	7.III 9.III 13.III	0 +	0 +	0 0		GUÉRISON EN 2 JOURS RÉCIDIVE GUÉRISON
Staphylococcie Pén. St.	Muguet. Toxicose Troubles digestifs	18.V	+	+	0	0	<i>C. albic</i>	6,25µg	1	2	21.V 23.V	0 0	+	0 0		GUÉRISON RAPIDE
Anémie grave Pén. Ery. St. Chl. Sulf.	Muguet	27.VII	+	+	0		<i>C. albic</i>		0,6	4	3.VII	0	0	0		GUÉRISON RAPIDE
Toxicose Au. Chl. Pén. St. Sulf.	Muguet Chute de poids Diarrhée	26.VI	+	+			<i>C. albic</i>		0,25	4	31.VII	0	0			GUÉRISON EN 24 HEURES REPRISE DE POIDS 4 JOURS
Toxicose Au. Chl. Pén. Ter.	Muguet Troubles digestifs	2.VII	+	+			<i>C. albic</i>	6,25µg	0,5	2	6.VII	0	0			GUÉRISON EN 24 HEURES
Troubles respirat. Pén.	Muguet Diarrhée++	8.VI	+	+	0		<i>C. albic</i>	3,15µg	0,5	4	13.VI	0	0			GUÉRISON RAPIDE
(prématuré)	Muguet	4.X	+				<i>C. albic</i>	6,25µg	0,15	4	8.X	0	0			GUÉRISON RAPIDE
(prématuré)	Muguet-Diarrhée	18.X	+	+			<i>C. albic</i>	6,25µg	0,1	4	26.X	0	0			GUÉRISON RAPIDE
(prématuré)	Muguet	4.X	+	+			<i>C. albic</i>	10,0 µg	0,15	4	15.X	0	0			GUÉRISON RAPIDE RÉCIDIVE APRÈS 15 JOURS
Leucémie	Muguet	27.IX	+	+	0		<i>C. albic</i> <i>Geotrich</i> (selles)	6,25µg 12,5 µg	localement 0,3	4	1.X 17.X 21.X	+	+	0 0		AMÉLIORATION GUÉRISON EN 3 JOURS
Leucémie St. Pén. Chl.	Muguet	2.VIII	+				<i>C. albic</i>	6,25µg	0,3 localement	4	6.VIII	0				AMÉLIORATION

tion complète ou presque complète de *C. albicans* dans les divers prélèvements où le nombre de *Candida* était considérable et associé à des manifestations pathologiques (muguet, troubles digestifs, troubles toxiques, troubles urinaires, abcès, perte de poids, éruption cutanée). Dans de rares cas, pour obtenir la suppression totale de cette flore mycologique, il est nécessaire d'effectuer un deuxième traitement de quatre jours ; on remarque qu'il s'agit des malades Lac..., Gue..., Sch... où, dans les selles, à côté de *C. albicans*, on a isolé le *Geotrichum* en quantité importante. Rappelons ici qu'*in vitro* *Geotrichum* se montre moins sensible que *C. albicans* à la nystatine.

Le tableau V résume l'action de la nystatine sur *Geotrichum* et *C. albicans*, trouvés à plusieurs reprises en quantité abondante dans les prélèvements de langue et dans les selles de la malade Mar... ; cette malade présentait depuis six mois des troubles digestifs (langue blanche, diarrhée). L'administration de la nystatine par voie buccale a amené la disparition rapide des *Candida* suivie ultérieurement de la diminution des colonies de *Geotrichum*, parallèlement à la guérison des manifestations cliniques. L'arrêt du traitement est suivi après dix jours d'une récidive passagère et ensuite différents contrôles montrent un saprophytisme modéré de *Geotrichum* (2-4 colonies par tube dans les

TABLEAU V. — Action de la nystatine sur un cas de géotrichose et de moniliose digestives (malade Mar., ♀, adulte).

MANIFESTATIONS FONGIQUES	PRÉLÈVEMENTS	IDENTIFICATION	NOMBRE DE COLONIES PAR TUBE					NYSTATINE	
			Avant traitement	Au cours du traitement			Après traitement 2 mois	Dose journalière	Durée
				3 ^e jour	6 ^e jour	9 ^e jour			
Langue blanche Diarrhée	Gorge	<i>Geotrichum</i> sp.	20	12	10	1	3	0,5 g. à 1 g.	20 jours
		<i>C. albicans</i>	20	10	1	0	0		
	Selles	<i>Geotrichum</i> sp.	20	15	12	1	3		
		<i>C. albicans</i>	10	5	3	0	0		

prélèvements de langue et dans les selles), sans manifestations pathologiques.

Les 9 autres cas d'infections localisées à *Candida*, dont les détails seront donnés dans d'autres publications ont également répondu favorablement à l'action thérapeutique de cet antibiotique. Parmi ceux-ci signalons un cas de pharyngite granuleuse et de broncho-moniliase à *C. albicans* chez un adulte et un cas de muguet et perlèche associés à un onyxis et périonyxis à *C. albicans* chez un enfant (cas Cha...). Dans ce dernier cas le muguet et la perlèche ont disparu en trois jours après l'administration par voie buccale de 250 mg de nystatine par jour. Les ongles traités localement par la pommade à la nystatine présentent une nette amélioration, une semaine après le début du traitement. Dans un cas de vaginite à *Candida*, les levures présentes à plusieurs reprises, en grand nombre, dans les prélèvements vaginaux, ont disparu après le traitement par ovules à 0,100 g (5 par jour), après trois jours de traitement.

Les manifestations pathologiques fongiques des 35 cas étudiés dataient en général de plusieurs jours, souvent de plusieurs

semaines lorsque le malade nous était présenté. Pendant cette période toutes les thérapeutiques ordinaires (bains alcalins, amines quaternaires, tyrothricine, etc.) avaient échoué. Dans le cas de l'enfant Cha..., âgé de 3 ans, la perlèche et le muguet dataient de deux ans et étaient consécutifs à un traitement anti-coquelucheux au chloramphénicol; l'onyxis et le périonyxis dataient d'un an.

Dans tous les cas mentionnés, les lésions des muqueuses sont guéries rapidement et les récurrences sont rares. Sur les 25 malades des tableaux III et IV on remarque seulement deux récurrences après quinze jours de traitement.

Discussion.

Jusqu'à présent on ne disposait, pour lutter contre les levures pathogènes, que de moyens peu efficaces. Contre les mycoses à *Candida*, en dehors du traitement local (bains alcalins, violet de gentiane, tyrothricine, amines quaternaires) divers traitements généraux comme le violet de gentiane par voie veineuse [22], l'acide undécylénique par voie buccale [20], divers dérivés de l'acide *p*-hydroxybenzoïque [19] avaient été proposés.

Divers antibiotiques comme la tyrothricine, la streptothricine, la gliotoxine, etc., agissant *in vitro* sur les champignons se sont montrés soit trop toxiques pour être utilisés chez l'homme, soit inactivés dans l'organisme; d'autres antibiotiques ont été étudiés [13, 27], mais ne sont pas entrés dans la phase d'essai clinique.

La nystatine se montre particulièrement active sur les *Candida*. Son action *in vitro* et sur les infections expérimentales, ainsi que sa faible toxicité ont permis son application en thérapeutique humaine. Les résultats cliniques obtenus par les chercheurs français [1, 3, 6, 15] sur les infections à *Candida* sont les premiers résultats signalés dans la littérature.

Avant d'aborder l'activité thérapeutique de cet antibiotique, il convient de discuter brièvement les conditions qui favorisent la fréquence et la gravité des manifestations pathologiques à *Candida* qui sont actuellement observées.

On incrimine en premier lieu, en dehors de l'affaiblissement de la résistance de l'organisme malade, l'emploi intensif d'antibiotiques antibactériens à large spectre qui, supprimant la flore bactérienne intestinale favorise le développement de la flore mycologique normalement saprophyte. Cette action est largement démontrée non seulement par des observations cliniques [1, 3, 9, 11, 16, 19, 28], mais également par des études expérimentales [24, 26].

Dans notre étude, parmi les 35 cas d'infections à *Candida*,

à l'exception de quelques prématurés présentant un muguet dès les premiers jours de la vie, tous les autres cas avaient subi avant l'apparition des manifestations fongiques un traitement intensif aux antibiotiques pour des infections bactériennes rebelles. Le plus souvent il s'agissait d'une association d'antibiotiques antibactériens, en particulier l'auréomycine, le chloramphénicol, la terramycine, l'érythromycine. Il est à signaler que l'action favorisante de ces antibiotiques sur le développement des *Candida* est prouvée seulement *in vivo* ; *in vitro* les principales études faites à ce sujet [18] montrent qu'ils n'ont aucune action sur la croissance des *Candida*.

D'autres travaux expérimentaux [8, 17, 21, 23, 25] ont démontré récemment que la cortisone et l'ACTH favorisent le développement des infections fongiques. Six des malades étudiés, tous leucémiques, ont également subi un traitement par ces hormones.

L'activité *in vivo* de la nystatine étant prouvée, il reste à déterminer la posologie exacte et la durée du traitement. La nystatine obtenue actuellement n'est pas encore définie du point de vue chimique. L'activité antifongique exprimée en unités par milligramme de produit varie suivant chacun des lots expérimentés. De même que chez les animaux, l'administration de la nystatine par voie buccale a montré chez l'homme une parfaite tolérance. Il en est de même de l'application cutanée ou sur les muqueuses. Le contact intime de l'antifongique et de *Candida*, du fait même de la localisation sur les muqueuses, explique en grande partie les résultats spectaculaires obtenus dans les cas de manifestations digestives.

Les résultats cliniques et expérimentaux sur le lapin sont en concordance avec les résultats dernièrement obtenus par Sternberg et coll. sur la flore intestinale normale de la souris, sur l'infection expérimentale à *C. albicans* du tractus gastro-intestinal de la souris et sur la flore mycologique des selles humaines.

Conclusions et résumé.

L'action d'un nouvel antibiotique antifongique, la nystatine (fungicidine), est étudiée *in vitro* sur de nombreuses souches de *Candida* et *Geotrichum* et *in vivo* sur l'infection expérimentale du lapin par *C. albicans* et sur 35 cas humains d'infections généralisées ou localisées à *C. albicans*. Les résultats sont les suivants :

1° *In vitro*. — La nystatine se montre active sur toutes les espèces de *Candida* (55 souches) et sur *Geotrichum* (5 souches), inhibant leur croissance à des concentrations variant entre 1,56 et 12,5 μg par centimètre cube ; la sensibilité en milieu liquide est plus grande qu'en milieu gélosé.

L'action de la nystatine n'est pas seulement fongistatique mais également fongicide.

2° *In vivo*. — Chez le lapin infecté par voie digestive avec *C. albicans*, l'administration de nystatine amène une réduction considérable du nombre des levures de l'intestin. La mortalité du lapin infecté par *C. albicans* par voie intraveineuse est de 100 p. 100. Elle est réduite à 62,5 p. 100 par l'administration parentérale de 40 mg de nystatine par jour pendant cinq jours. La nystatine administrée par voie digestive chez l'animal est dépourvue de toxicité à des doses élevées (3 g par kilogramme).

Dans les 35 cas d'infections généralisées ou localisées à *C. albicans*, la nystatine s'est montrée remarquablement efficace, tant du point de vue clinique (disparition des troubles digestifs, urinaires, toxiques et des lésions buccales) que du point de vue laboratoire.

Les *Candida* ont diminué ou disparu complètement de la bouche, des selles, des urines ou du sang en quatre à cinq jours après l'administration de l'antibiotique (doses variant entre 200 mg à 1 g par jour pendant quatre à cinq jours). Sur ces 35 cas il y a eu quelques récidives (3 cas), en général deux semaines après l'arrêt du traitement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BERNARD, G. MATHÉ et E. DROUHET. *Soc. Hémat.*, 18 novembre 1954 ; *Le Sang*, 1954 (sous presse).
- [2] R. BROWN, E. L. HAZEN et A. MASON. *Science*, 1953, **117**, 609.
- [3] R. DEBRÉ, P. MOZZICONACCI, E. DROUHET, V. DROUHET et A. HOPPELER. *Soc. Fr. Pédiat.*, 4 juin 1954 ; *Ann. Paediatrici*, 1954 (sous presse).
- [4] DUBROUX et coll. *Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp.*, 1954, **70**, 611.
- [5] E. DROUHET et M. COUTEAU. *Ces Annales*, 1954, **86**, 602.
- [6] E. DROUHET. *VIII^e Cong. Intern. Bot.*, Paris, 1954, Section Antib. Myc. Méd. (Discussion).
- [7] J. D. DUTCHER, G. BOYACK et S. FOX. *Antibiotics Ann.*, 1953-1954.
- [8] J. FRIEDMAN, F. J. ROTH, A. A. WERDER et J. T. SYVERTON. *Feder. Proc.*, 1952, **11**, 415.
- [9] J. GRASSET, J. SÉNÈZE et R. GAUTHIER. *Soc. Gynéc. Obst.*, 1^{er} mars 1954.
- [10] E. L. HAZEN et R. BROWN. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1951, **76**, 93.
- [11] A. M. KLIGMAN. *J. Amer. Med. Ass.*, 1952, **149**, 979.
- [12] M. LAMY, M. AUSSANAIRE, M.-L. JAMMET et M. K. CARAMANIAN. *Arch. Fr. Pédiat.*, 1953, **10**, 71.
- [13] H. LECHEVALLIER. *La Presse Méd.*, 1953, **61**, 1327.
- [14] M. LELONG, F. ALISON, LE TAN VINH, DAO VAN TY, G. DES MONTS et J. CABANES. *Ann. Méd.*, 1953, **54**, 5.
- [15] M. LELONG. *Soc. Pédiat.*, 2 juin 1954 (Discussion).
- [16] M. J. LIPNICK, A. M. KLIGMAN et R. SRAUSS. *J. Invest. Dermat.*, 1952, **18**, 247.

- [17] Z. MANKOWSKI et B. J. LITTLETON. *Antibiot. Chemother.*, 1954, **4**, 253.
- [18] U. MARCELOU et G. SEGRETAIN. *Ces Annales*, 1954, **87**, 229.
- [19] W. I. METZGER, L. T. WRIGHT et J. C. DI LORENZO. *J. Amer. Med. Ass.*, 1954, **155**, 352.
- [20] D. C. MOUNTAIN et F. P. KRUMENACHER. *Amer. J. med. Sci.*, 1953, **225**, 274.
- [21] P. REDAELLI et L. PIANTONI. VIII^e Congrès intern. Botanique Paris, 1954, *Atti. Congr. Nat. Soc. Ital. Patol. Sienne*, 1953.
- [22] R. ROSSI. *Rev. Clin. Pediatr.*, 1953, **52**, 529.
- [23] G. H. SCHERR. *Mycopathol. et Mycol. applic.*, 1953, **6**, 325.
- [24] E. SELIGMANN. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1952, **79**, 481.
- [25] E. SELIGMANN. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, 1953, **83**, 779.
- [26] T. H. STERNBERG et coll. *Antibiotics Ann.*, 1953-1954, p. 109.
- [27] S. A. WAKSMAN, A. H. ROMANO, H. LECHEVALLIER et F. RAUBITSCHK. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1952, **6**, 163.
- [28] J. W. WOODS, J. H. MANNING et C. N. PATTERSON. *J. Amer. Med. Ass.*, 1951, **145**, 207.

RÉSISTANCE DU BACILLE DE WHITMORE ACQUISE IN VITRO ET IN VIVO A L'ÉGARD DU CHLORAMPHÉNICOL, DE L'AURÉOMYCINE ET DE LA TERRAMYCINE

par L. CHAMBON (*).

(Institut Pasteur de Saigon.)

Nous avons étudié dans un travail antérieur (L. Chambon et coll. [1]) la sensibilité du bacille de Whitmore aux antibiotiques, *in vitro* et chez des malades atteints de mélioïdose, et nous avons vu qu'une résistance directe au chloramphénicol et une résistance croisée à l'auréomycine et à la terramycine peuvent apparaître *in vivo*.

Afin de déterminer les conditions d'apparition de ces résistances nous avons exposé cinq souches de *Malleomyces pseudomallei* à des concentrations croissantes de chloramphénicol, d'auréomycine, de terramycine et de leurs associations par couple.

D'autre part, les variations de la sensibilité à ces antibiotiques de trois d'entre elles ont pu être suivies au cours du traitement de trois cas de mélioïdose. La comparaison des faits observés *in vivo* et *in vitro* nous permet ainsi de tirer des conclusions d'ordre thérapeutique.

I. — MATÉRIEL.

Il est constitué par cinq souches de bacille de Whitmore isolées dans les conditions suivantes (Collomb et Boubé [2]; L. Chambon et coll., *loc. cit.*) :

Souche 53.412. — Mélioïdose à forme pulmonaire (Sal. B. B.). Culture de crachats.

Souche 52.95. — Mélioïdose à forme septico-pyohémique (Dej.). Hémoculture.

Souche 52.430. — Mélioïdose à forme pulmonaire (Holm.). Culture de crachats.

Souche 52.492. — Mélioïdose à forme septico-pyohémique (Gir.). Hémoculture.

Souche 51.274. — Culture de liquide synovial.

(*) Manuscrit reçu le 23 novembre 1954.

II. — TECHNIQUE.

La sensibilité initiale au chloramphénicol, à l'auréomycine et à la terramycine est déterminée par la technique des dilutions sériées en tubes : 0,5 ml d'une solution à 10^{-4} d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon nutritif est introduit dans 0,5 ml de dilutions d'antibiotiques variant en progression géométrique de raison 2 de façon à obtenir des concentrations finales allant de 100 à 0,39 $\mu\text{g/ml}$.

Le point limite choisi correspond à l'inhibition totale de la croissance après vingt-quatre heures d'étuve à 37°.

La même technique est utilisée pour tester les souches après transferts en présence d'antibiotiques.

Les transferts sont effectués de la façon suivante : 0,5 ml d'une dilution à 10^{-4} d'une culture en bouillon nutritif est porté dans 0,5 ml d'une dilution d'antibiotique dont la concentration est égale à la moitié de la concentration inhibitrice minima (CIM) initiale ; pour les couples d'antibiotiques, l'association se fait en tenant compte de la CIM de chacun des deux composants. Après quarante-huit heures d'étuve à 37°, un deuxième transfert est effectué dans les mêmes conditions. Ce deuxième transfert est lui-même incubé quarante-huit heures à 37°, puis on fait un isolement sur gélose pour contrôle de pureté et on détermine sa sensibilité aux antibiotiques ; la culture est alors mise au congélateur à -20° jusqu'au lendemain où on peut l'ensemencer dans des concentrations d'antibiotiques et d'associations d'antibiotiques correspondant à la moitié des nouvelles CIM ; cette culture constitue le troisième transfert.

Les passages sont poursuivis dans les mêmes conditions jusqu'au vingtième transfert.

Pour chaque souche, un témoin est transféré de la même façon dans du bouillon nutritif sans addition d'antibiotique.

Les variations de la résistance au chloramphénicol, à l'auréomycine et à la terramycine sont exprimées par le rapport

$$R = \frac{\text{CIM Tf}}{\text{CIM Tfm}}, \text{ CIM Tf et CIM Tfm désignant respectivement}$$

la concentration inhibitrice minima pour les germes transférés en présence d'antibiotique et la concentration inhibitrice minima pour les germes transférés sans antibiotique.

III. — RÉSULTATS.

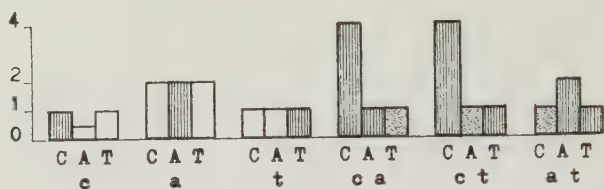
1° VARIATIONS DE LA RÉSISTANCE AU CHLORAMPHÉNICOL, A L'AURÉOMYCINE ET A LA TERRAMYCINE APRÈS 20 TRANSFERTS. — Le tableau I et les figures 1 et 2 rendent compte des résultats suivants.

TABLEAU I. — Variation de la résistance au chloramphénicol, à l'auroéomycine et à la terramycine après 20 tr. nsferts.

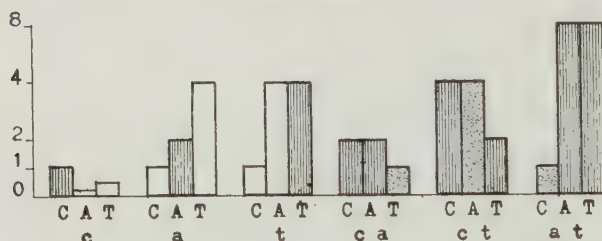
SOURCES	C.I.M. Tfm20			CULT. EN PRESENCE DE:	C		A		T		CULT. EN PRESENCE DE:	C		A		T	
	C	A	T		CIM TF20	R	CIM TF20	R	CIM TF20	R		CIM TF20	R	CIM TF20	R	CIM TF20	R
51.274	12,5	100	50		12,5	1	50	1/2	50	1		25	2	200	2	100	2
52.95	6,25	25	25		6,25	1	6,25	1/4	12,5	1/2		6,25	1	50	2	100	4
52.492	25	100	50	c	25	1	100	1	50	1	a	25	1	400	4	400	8
53.430	6,25	25	25		12,5	2	50	2	25	1		6,25	1	200	8	100	4
53.412	3,125	50	12,5		1,56	1/2	12,5	1/4	12,5	1		1,56	1/2	400	8	100	8
51.274	12,5	100	50		50	4	100	1	50	1		50	4	100	1	50	1
52.95	6,25	25	25		12,5	2	50	2	25	1		25	4	100	4	50	2
52.492	25	100	50	ca	100	4	100	1	50	1	ct	50	2	400	4	100	2
53.430	6,25	25	25		200	32	100	4	50	2		50	8	100	4	50	2
53.412	3,125	50	12,5		25	8	200	4	200	16		12,5	4	200	4	100	8

La résistance au chloramphénicol (C), à l'auroéomycine (A) et à la terramycine (T) est indiquée par le rapport $R = \frac{\text{CIM TF20}}{\text{CIM Tfm20}}$.

Le chloramphénicol n'augmente du double la résistance à cet antibiotique et à l'auréomycine que pour une seule souche et



Souche 51.274



Souche 52.95



Souche 52.492

C,A,T:résistance aux antibiotiques (R)

c,a,t,ca,ct,at:culture en présence des antibiotiques

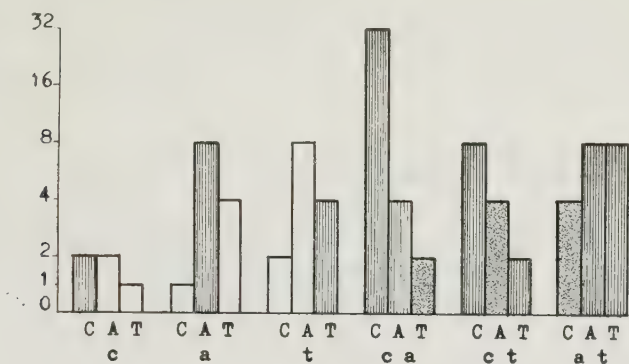
FIG. 1.

donne une sensibilité à l'auréomycine quatre fois plus grande pour deux souches,

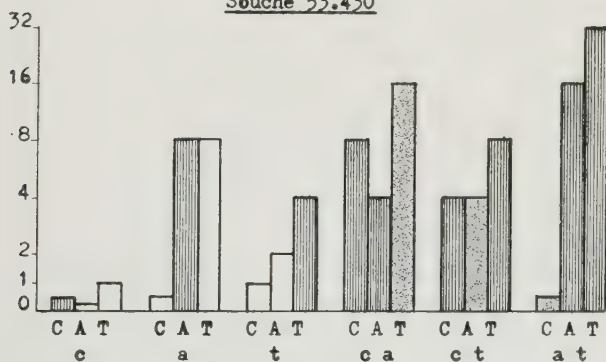
L'auréomycine ne modifie pas la sensibilité au chloramphénicol, mais induit une résistance directe à l'auréomycine et croisée à la terramycine.

Les conclusions sont sensiblement les mêmes pour la terramycine.

Les couples « chloramphénicol + auréomycine » et « chlor-



Souche 53.430



Souche 53.412

Résistance acquise:	{	Directe		Résistance (Directe acquise par association)	
		Croisée			

FIG. 2.

amphénicol + terramycine » se comportent à peu près de la même façon : ils font apparaître une résistance au chloramphénicol de deux à trente-deux fois plus grande et, pour trois souches sur cinq, une résistance à l'auréomycine et à la terramycine de deux à seize fois plus grande.

Le couple « auréomycine + terramycine » modifie peu la sensibilité au chloramphénicol, mais multiplie de deux à trente-deux fois la résistance à l'auréomycine et à la terramycine.

D'une façon générale nous pouvons conclure que :

En présence du chloramphénicol, le bacille de Whitmore n'acquiert ni une résistance directe à cet antibiotique ni une résistance croisée à la terramycine, et a tendance à devenir plus sensible à l'auréomycine.

TABLEAU II. — Évolution de la résistance de la souche 53.412 au cours de 20 transferts.

Cultu- re en présen- ce de:	Résistance à:			Cultu- re en présen- ce de:	Résistance à:			Cultu- re en présen- ce de:	Résistance à:		
	C	A	T		C	A	T		C	A	T
c	1	1	1	a	1	1	1	t	1	1	1
	1	1	1/2		1	1/2	1		1	1/4	1/2
	1	2	1/2		1	1/2	1		1	1/2	1
	1	2	1/2		1	1/2	1		4	1	1
	1	1	1		1	2	1		4	1	2
	1	1/2	1/2		2	2	2		4	2	4
	1	1/2	1		2	4	4		2	2	4
	1	1/2	1		2	4	4		2	2	4
	1	1/2	1		1	4	4		1	2	4
	1/2	1/2	1		1	4	4		1	2	4
	1/2	1/4	1		1/2	8	8		1	2	4
	1/2	1/4	1		1/2	8	8		1	2	4
ca	1	1	1	ct	1	1	1	at	1	1	1
	1	1/2	1/2		2	1/2	1/2		1	1/2	1/2
	2	1	1/2		2	1	1/2		1	8	1/2
	2	2	1		2	2	1/2		1	8	4
	2	2	2		4	2	1		1	8	4
	4	4	4		4	4	4		1	8	8
	4	4	8		4	4	4		1	8	8
	4	4	8		4	4	4		1	8	8
	4	4	8		4	4	4		1	8	8
	4	4	16		4	4	4		1/2	8	8
	8	4	16		4	4	8		1/2	8	16
	8	4	16		4	4	8		1/2	16	32

La résistance aux antibiotiques est indiquée par le rapport $R = \frac{\text{CIM Tr}}{\text{CIM Tm}}$.

L'auréomycine et la terramycine et leur association font apparaître une résistance directe et croisée à ces deux antibiotiques, sans changement de la sensibilité au chloramphénicol.

Les couples « chloramphénicol + auréomycine » et « chloramphénicol + terramycine » augmentent toujours la résistance

au chloramphénicol et, dans la majorité des cas, à l'auréomycine et à la terramycine.

2° EVOLUTION DE LA RÉSISTANCE D'UNE SOUCHE AU COURS DE 20 TRANSFERTS. — Le tableau II et les figures 3 et 4 montrent

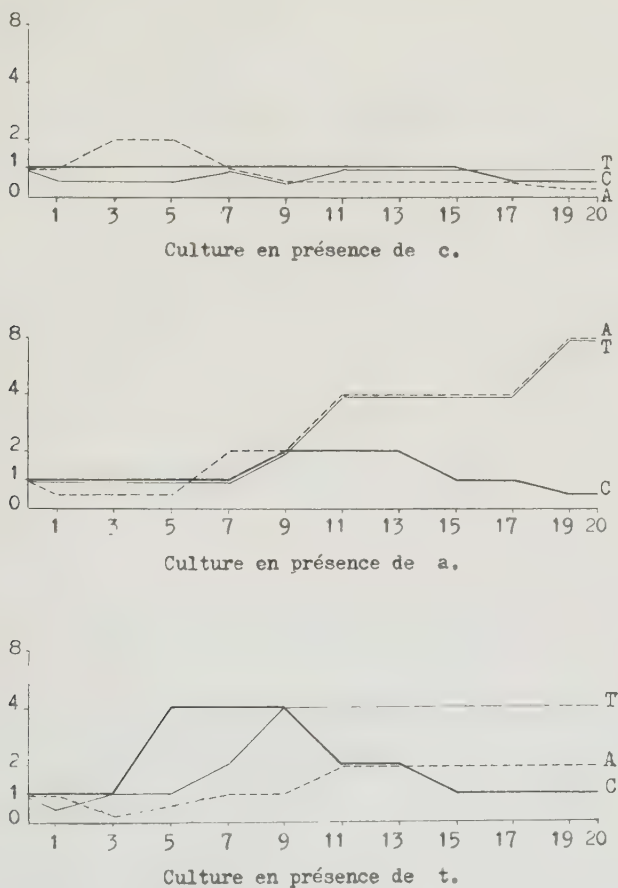


FIG. 3. — Evolution de la résistance de la souche 53.412.

l'évolution des résistances directes et croisées au cours des transferts pour la souche 53.412.

Au contact du chloramphénicol, l'augmentation de la sensibilité à l'auréomycine ne devient nette qu'à partir du dix-neuvième transfert.

En présence de l'auréomycine et de la terramycine, les résistances directes et croisées à ces deux antibiotiques apparaissent aux septième et neuvième transferts et restent stationnaires ou augmentent progressivement par la suite. Il apparaît, entre les

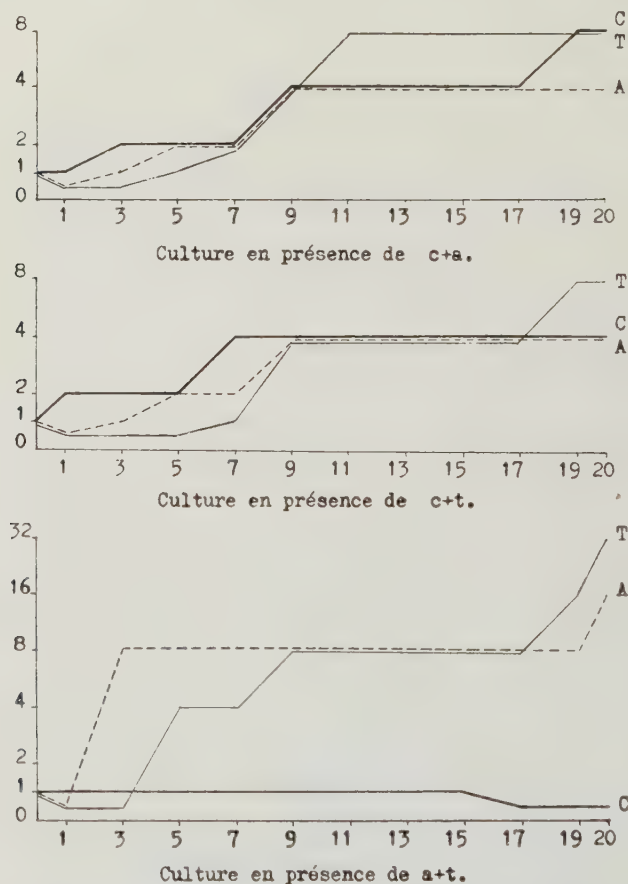


FIG. 4. — Evolution de la résistance de la souche 53.412.

cinquième et treizième transferts, une résistance transitoire au chloramphénicol.

En présence des couples « chloramphénicol + auréomycine », « chloramphénicol + terramycine » et « auréomycine + terramycine », les résistances directes et croisées se manifestent plus précocement pour le chloramphénicol et l'auréomycine que pour

la terramycine et augmentent ensuite par paliers aux neuvième et onzième transferts et aux dix-neuvième et vingtième transferts.

3° COMPARAISON ENTRE LES CONDITIONS D'APPARITION DE LA RÉSISTANCE DU BACILLE DE WHITMORE AUX ANTIBIOTIQUES « IN VITRO » ET « IN VIVO ». — La complexité des phénomènes qui conditionnent l'action des antibiotiques et l'apparition des résistances doit faire interpréter avec prudence les résultats obtenus *in vitro*.

TABLEAU III. — Comparaison entre la résistance acquise du bacille de Whitmore, aux antibiotiques *in vivo* et *in vitro*.

Noms des malades	N° des souches	I N V I V O				I N V I T R O			
		Traitement suivi:	Résistance à (1)			20 trans- ferts en présence de	Résistance à (2)		
			C	A	T		C	A	T
Sal.B.B.	53.412	C = 16,5	16	8	8	C	1/2	1/4	1
		C+A = 11 g + 6 g				CA	8	4	16
		C+T = 70 g +48 g				CT	4	4	8
Dej.	52.95	Strepto : 8 g. C+Strepto:50g.+20g. C = 26 g.	R	S	?	C	1	1/4	1/2
Gir.	52.492	A = 22 g.	R	S	?	A	1	4	8
		C = 65 g.				C	1	1	1

(1) R : souche initialement sensible devenue résistante } lecture qualitative;
 S : souche initialement résistante devenue sensible } (technique des disques;
 16-8, etc... : Rapport $\frac{\text{C.I.M. après traitement}}{\text{C.I.M. initiale}}$ (tech. des dilutions sériées)

(2) Rapport : CIMTf20 / CIMTfm20.

C'est pourquoi nous avons comparé les variations de la sensibilité de trois souches de *Malleomyces pseudomallei* au chloramphénicol, à l'auréomycine et à la terramycine après contact avec ces antibiotiques ou leurs associations *in vivo* chez des malades et *in vitro*.

Il apparaît sur le tableau III que la souche 53.412 se comporte de la même façon *in vitro* et *in vivo* sous l'action des couples « chloramphénicol + auréomycine » et « chloramphénicol + terramycine » qui augmentent dans des proportions comparables sa résistance à ces antibiotiques.

La sensibilité à l'auréomycine de la souche 52.95 augmente *in vivo* et *in vitro* sous l'effet du chloramphénicol, mais sans apparition d'une résistance directe *in vitro*.

Le chloramphénicol ne modifie pas *in vitro* la sensibilité de la souche 52.492, alors que chez le malade cette souche devient résistante au chloramphénicol et sensible à l'auréomycine.

Cette comparaison met nettement en évidence l'action des couples « chloramphénicol + auréomycine » et chloramphénicol + terramycine » sur l'apparition d'une résistance des bacilles de Whitmore au chloramphénicol ; elle confirme dans un cas l'accroissement de la sensibilité à l'auréomycine au contact du chloramphénicol.

IV. — CONCLUSIONS.

Cette étude approfondit nos connaissances sur la sensibilité du bacille de Whitmore aux antibiotiques.

Le chloramphénicol possède une nette action bactéricide sur la plupart des souches de *Malleomyces pseudomallei*.

Dans les rares cas où elle se manifeste, l'action inhibitrice de l'auréomycine et de la terramycine peut être utilisée car, contrairement à ce qui se passe pour la majorité des germes Gram-négatifs, il n'y a pas de résistance croisée entre ces deux antibiotiques employés seuls et le chloramphénicol.

Les associations « chloramphénicol + auréomycine » et « chloramphénicol + terramycine », quoique synergiques pour quelques souches, paraissent devoir être proscrites parce que responsables de l'apparition d'une résistance au chloramphénicol, à l'auréomycine et à la terramycine.

Il peut se faire que l'apparition de la résistance au chloramphénicol s'accompagne d'un accroissement de la sensibilité à l'auréomycine ; dans les cas où il n'en va pas ainsi, nous nous trouvons actuellement dépourvus d'antibiotique actif sur les souches devenues résistantes au chloramphénicol.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. CHAMBON, P. DE LAJUDIE et J. FOURNIER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 139.
- [2] COLLOMB et BOUBÉ. *Rev. médico-chir. des F. A. E. O.*, 1953, 3^e année, n° 3.

ÉTUDES SUR LA VIRULENCE DES BACILLES TUBERCULEUX RÉSISTANTS A L'ISONIAZIDE

par H. NOUFFLARD (*).

(Laboratoires de Recherches pharmaceutiques
de la Société des Usines Rhône-Poulenc à Vitry-sur-Seine.)

A la fin de 1952 et au début de 1953, il fut annoncé que les bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide, dont la fréquence s'avérait impressionnante, avaient un pouvoir pathogène diminué pour les animaux de laboratoire.

Il s'agissait là d'un fait nouveau. En effet, dès la découverte de la résistance à la streptomycine, la question avait été posée de la signification de ce phénomène constaté *in vitro* et les expériences de Feldman [1] y avaient aussitôt répondu : les cobayes auxquels ont été injectés des bacilles résistants à la streptomycine présentent une tuberculose qui ne diffère de la tuberculose habituelle que par l'inefficacité qu'a sur elle le traitement par la streptomycine. Sur la foi de ces expériences, on a admis en général que les bacilles tuberculeux résistants ne différaient de leurs parents sensibles que par ce seul caractère de la résistance et qu'ils restaient aussi virulents.

Aujourd'hui, les publications sur la virulence des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide se sont multipliées et elles établissent que celle-ci est en effet nettement atténuée si on l'étudie chez le cobaye, par injection sous-cutanée, et ceci qu'il s'agisse de bacilles isolés chez des malades traités ou de bacilles rendus résistants à l'isoniazide *in vitro* [2-11]. Quelques publications cependant font état de tuberculoses à évolution normalement rapide [10, 15]. Morse [10] a sans doute donné l'explication de ces discordances, en indiquant que, dans les expériences où les bacilles résistants ont été virulents pour le cobaye, rien ne semblait avoir été fait pour assurer l'homogénéité de la souche, les bacilles retrouvés dans les lésions viscérales paraissant nettement moins résistants que l'ensemble de la souche injectée. Dans son très intéressant travail, G. Meissner [12] a indiqué, en outre,

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} juillet 1954.

qu'en pareil cas on retrouvait de moins en moins de bacilles résistants à mesure qu'on sacrifiait l'animal plus tard.

Les auteurs qui ont étudié la virulence par l'injection à la souris se sont montrés beaucoup moins optimistes [2, 9, 10, 16, 17]. Ils ont trouvé les bacilles résistants à l'isoniazide soit aussi virulents que les autres, soit à peine moins virulents, en tous cas toujours beaucoup plus virulents que le BCG, comme l'ont bien souligné N. Rist et ses collaborateurs [9]. Peut-être la différence entre souris et cobaye tient-elle à ce fait que l'infection expérimentale est beaucoup plus sévère chez la souris puisqu'elle se fait par voie intraveineuse. Pourtant Middlebrook a injecté au cobaye par voie intraveineuse des bacilles résistants à l'isoniazide et il a trouvé à la plupart d'entre eux, même par cette voie, une virulence atténuée [6]. Il est donc possible que le degré de virulence de ces bacilles soit variable d'une espèce à l'autre.

Cette différence de virulence pour des espèces différentes est un des arguments invoqués pour exhorter les médecins à la prudence, comme l'ont fait invariablement tous les auteurs qui ont écrit sur ce sujet, et nous ferons comme eux. Seule l'étude des tuberculoses d'invasion humaines pourra répondre à la question.

Cependant il reste deux points que le laboratoire peut chercher à éclaircir et qui nous paraissent de grande importance :

1° Les lésions généralisées consécutives à l'inoculation de bacilles résistants à l'isoniazide leur sont-elles réellement imputables, ou sont-elles dues à des bacilles sensibles mélangés aux bacilles résistants ? Ceci peut être étudié par l'inoculation aux animaux de souches certainement pures, sélectionnées par passage dans des milieux contenant de l'isoniazide, et mieux encore, par l'étude de la sensibilité des bacilles isolés dans les lésions viscérales. Peu de publications ont été consacrées à ce dernier point, et elles sont assez contradictoires : Morse [10], Nitti [7] ont trouvé des bacilles sensibles toutes les fois que les animaux présentaient des lésions viscérales importantes, Karlson et Ikemi [14], Barnett et ses collaborateurs [11], Mitchison [13] y ont isolé des bacilles résistants, Meissner [12], nous l'avons dit, des bacilles résistants, puis sensibles.

2° Un bacille résistant à l'isoniazide et de virulence atténuée l'est-il de façon définitive ? N'est-il pas possible de lui faire retrouver sa virulence par le moyen habituel, c'est-à-dire par des passages successifs sur des animaux de laboratoire ? Et en ce cas conserve-t-il sa résistance ? Nous ne connaissons pas d'expériences publiées sur ces derniers points.

Nos expériences ont surtout eu pour but de répondre à ces questions. Elles ont toutes été faites sur des souris, bien que l'atténuation de la virulence soit moins nette pour cet animal. Nous ne nous cachons pas que c'est un inconvénient et des

expériences semblables mériteraient d'être refaites sur des cobayes. Mais il est avantageux de travailler sur de petits animaux, permettant d'avoir des groupes nombreux ; d'autre part, une inoculation bien contrôlée, dans des conditions d'expérience bien définies, donne des résultats suffisamment constants pour que des différences, même discrètes, soient appréciables. C'est pourquoi nous avons employé la souris. D'ailleurs, comme on va le voir, nous avons trouvé des différences de virulence très notables.

MÉTHODES.

BACILLES TUBERCULEUX UTILISÉS ET TESTS DE SENSIBILITÉ A L'ISONIAZIDE. — Nous avons étudié quatre souches de bacilles tuberculeux isolées chez des malades traités et trouvées hautement résistantes à l'isoniazide ; nous avons étudié aussi deux souches de laboratoire rendues *in vitro* résistantes à l'isoniazide. Enfin nous avons étudié à nouveau la résistance et la virulence d'une de ces souches après l'avoir récupérée des lésions d'une souris à laquelle elle avait été inoculée une première fois. Parallèlement, en manière de contrôle, nous avons inoculé à des souris des souches de bacilles normalement sensibles à l'isoniazide, en particulier celles-là mêmes à partir desquelles nous avons obtenu des souches résistantes *in vitro*.

La sensibilité à l'isoniazide de ces différents bacilles a été étudiée en milieu de Dubos sans Tween ; le résultat retenu a été celui de la lecture faite huit jours après l'ensemencement. Autant que possible le test de sensibilité a été fait au moment même de l'inoculation aux souris, ou, sur les bacilles récupérés des lésions des souris, directement sur la première culture. Ce point est important, car une diminution de la résistance à l'isoniazide au cours des repiquages successifs a été signalée.

Enfin pour trois de ces bacilles résistants (E., Bi. et Ravenel-résistant), nous avons vérifié que la résistance constatée *in vitro* correspondait bien à une réalité ; dans des expériences que nous ne détaillerons pas ici, nous avons traité par l'isoniazide des souris inoculées avec ces souches et vérifié que le traitement, efficace sur une tuberculose à bacilles sensibles, était sans action sur leurs lésions. Nous n'avons pas non plus observé d'aggravation nette par le traitement.

On trouvera détaillées ci-dessous l'origine de ces souches, leur sensibilité à l'isoniazide et la manière dont elles ont été étudiées et entretenues (tableau I).

ETUDE DE LA VIRULENCE. — Nous avons étudié la virulence des bacilles résistants toujours comparativement à celle d'une souche sensible inoculée à la même dose aux souris. Dans le cas des deux

souches de laboratoire rendues résistantes *in vitro*, la souche sensible de référence était la même souche, ayant subi les mêmes repiquages dans les mêmes milieux, mais sans isoniazide.

Il faut, dans une telle étude, que les conditions expérimentales soient rigoureusement standardisées en ce qui concerne les animaux inoculés et la quantité de bacilles injectés.

TABLEAU I.

Bacille	Origine	Sensibilité à l'isoniazide (1)	Remarques
Bi.	BK isolé chez un malade du sanatorium de Brévannes, traité par l'isoniazide.	50 - 100	Pas de passage en milieu avec isoniazide. Plusieurs sous-cultures entre le test et l'inoculation. Le BK récupéré des lésions des souris était cependant presque aussi résistant.
E.	- d° -	26 - 68	Pas de passage en milieu avec isoniazide. Test de sensibilité fait sur la culture ayant servi à l'inoculation.
Leq.	BK isolé chez une malade traitée par l'isoniazide	50 - 100	Pas de passage en milieu avec isoniazide. Plusieurs sous-cultures entre le test et l'inoculation, mais après encore de nombreux repiquages, ce bacille avait conservé sa résistance.
Ba.	- d° -	sup. à 100	Pas de passage en milieu avec isoniazide. Plusieurs sous-cultures entre le test et l'inoculation. Le BK récupéré des lésions des souris était aussi résistant.
Vallée.	2 repiquages de la culture résistante en présence de la concentration minima d'isoniazide de qui n'avait pas inhibé au bout de 15 jours ou 3 semaines.	100 - 1000	Passage par un milieu de Dubos sans Tween contenant 100 mcg/ml d'isoniazide, puis par un milieu au Tween sans isoniazide. Test de sensibilité fait sur la culture ayant servi à l'inoculation.
Vallée sensible	Les mêmes repiquages, mais dans des milieux sans isoniazide.	0,03 - 0,06	
Ravenel résistant	Comme Vallée, mais 3 repiquages.	10 - 50	Comme Vallée résistant
Ravenel sensible	Comme Vallée sensible	0,03 - 0,06	
Ravenel résistant	Isolément sur Löwenstein, puis repiquages en Dubos	sup. à 100	Pas de nouveau passage en milieu contenant de l'INH après isolement des poumons de la souris. Test de sensibilité fait sur la culture ayant servi à l'inoculation.

(1) Le premier chiffre indique la concentration maxima non inhibitrice, le deuxième la concentration minima inhibitrice au bout de huit jours, exprimées en mcg/ml.

Nous avons utilisé des souris blanches « Rockefeller Institute » de 3 à 5 semaines, de même âge à deux ou trois jours près dans une même expérience.

L'inoculation a été de 0,2 ml par voie intraveineuse, de cultures de sept à dix jours, en milieu de Dubos, dont les opacités avaient été égalisées à l'œil nu avec l'opacité d'un tube donné d'une gamme de référence, la même pour toutes les cultures dans une

même expérience, et ensuite plus ou moins diluée pour réaliser deux types d'expériences :

1° Des expériences où l'inoculation est forte (culture pure ou diluée au 1/10) et où le degré de virulence est apprécié par les durées de vie, la durée de la vie moyenne (T_{50}) et ses limites de confiance étant calculées par la méthode de Litchfield [18], par le pourcentage de survies dans un groupe quand tous les animaux d'un autre groupe sont morts, enfin par les lésions constatées à l'autopsie. Dans ces expériences chaque bacille a été inoculé à 10 à 16 souris (un seul groupe témoin a été réduit à 9 par la mort accidentelle d'un des animaux).

2° Une expérience où l'inoculation a été faible (culture diluée au 1/1 000) et où la virulence a été appréciée par la numération des bacilles dans la rate de 4 souris par souche étudiée, quinze jours après l'inoculation. Nous avons employé la technique décrite par Dubos et ses collaborateurs pour l'étude de l'immunisation [19]. La totalité de la rate a été broyée mécaniquement avec un broyeur de Teflon, en suspension dans 5 ml de solution de fraction V d'albumine, et cette suspension, ses dilutions au 1/10 et au 1/100 ont été ensemencées à l'anse de platine à la surface de milieux de Dubos gélosés. D'autre part nous avons vérifié par des numérations de bacilles dans les cultures inoculées, que les animaux avaient tous reçu à peu près le même nombre de bacilles.

RÉSULTATS.

On en trouvera le détail dans le tableau II pour les expériences de survie après forte inoculation, dans le tableau III pour les numérations de bacilles dans les rates après faible inoculation.

1° Sur les 6 souches résistantes que nous avons étudiées, 5 ont donné lieu à une tuberculose très atténuée par rapport à celle que nous voyons habituellement après une telle inoculation et que nous avons observée en effet avec les souches sensibles employées comme témoin.

Cette atténuation de la tuberculose était évidente dans nos expériences. Les numérations de bacilles dans les rates des animaux quinze jours après une inoculation faible, bien que nos comptes n'aient pas porté sur un nombre suffisant de gouttes pour être statistiquement valables, indiquent que les rates des animaux ayant reçu la souche résistante étaient environ dix à trente fois moins riches en bacilles que celles des animaux ayant reçu la souche sensible (tableau III).

Dans les expériences de survie après une inoculation forte, les animaux mouraient moins vite et leurs lésions étaient parfois beaucoup moins importantes. En effet, au moment où toutes les souris infectées avec un bacille sensible étaient mortes, toutes

TABLEAU II.

Souche de bacilles tuberculeux inoculée	Sensibilité in vitro à l'iso- niazide (1) (mcg/ml)	Durée de vie des té- moins inoculés avec un bacille sensible à l'isoniazide (jours)	Nombre de morts des souris inoculés avec des bacilles résistants à la date où tous les témoins sont morts	T ₅₀ témoins (jours)	T ₅₀ des animaux inoculés avec des bacilles résistants (jours)	Lésions (2)	Sensibilité in vitro à l'isoniazide des bacilles des lésions pulmonaires (1) (mcg/ml)
Ba.	50 - 100		0/10				
Témoin dans la même expérience = Ravenel	0,03 - 0,06	21 - 54		29,5 (22,3-38,9)	sup. à 98	+++ a) 10-100 +++ b) 10-50 (mais inhi- bition partielle au-dessous)	
E.	26 - 68		0/10		sup. à 98	++	10 - 50 (mais inhibition par- tielle au-dessous)
Témoin = Vallée	0,03 - 0,06	28 - 56		24,3 (21,6-42,5)		+++	
Leq.	50 - 100		10/14		31,4 (28,5-34,5)	++	1 - 5
Témoin = Vallée	0,03 - 0,06	24 - 35		26,6 (24,6-28,7)		++++	
Ba.	sup. à 100		2 ⁽⁵⁾ /13		sup. à 33	+	a) sup. à 100 b) sup. à 100
Témoin = Vallée	0,03 - 0,06	16 - 30 (4)		20,6 (17,9-22,7)		+	
Vallée résistant	100 - 1000		0/15		sup. à 35	+	
Témoin = Vallée	0,03 - 0,06	24 - 35		26,6 (24,6-28,7)		++++	
Ravenel résistant	10 - 50		0/16		sup. à 31	+	
Témoin = Ravenel	0,03 - 0,06	14 - 28		21,5 (19,2-23,9)		++++	
2 ^{ème} expérience							
			3/14 (7)		sup. à 75	++	sup. à 100
		12 - 25 (6)		17,5 (14,8-20,6)		++++	
Ravenel résistant							
repasé sur souris	sup. à 100		2/14		135,7 (28,5-45,6)	++	100 à 500
Témoin = Ravenel	0,03 - 0,06	16 - 24		18 (17,3-18,7)		++++	

- (1) Le premier chiffre indique la concentration maxima d'isoniazide non inhibitrice en huit jours, le deuxième la concentration minima inhibitrice en huit jours.
- (2) +++++, lésions, fines très nombreuses de type miliaire ou plus grosses mais subinfectées; ++++, lésions de même type mais moins intenses; ++, lésions mal circonscrites, moins envahissantes; +, quelques lésions nodulaires grises sur un fond de parenchyme sain.
- (3) Tesis faits sur les bacilles isolés des poumons de 2 souris a) et b).
- (4) 12 souris sur 13 mortes en seize à trente jours, la treizième sacrifiée au bout de trente-trois jours.
- (5) Ces 2 souris sont mortes d'une infection intercurrente.
- (6) 10 souris sur 12, mortes en douze à vingt-cinq jours, les 2 dernières sacrifiées au bout de soixante-quinze jours.
- (7) Ces 3 souris n'ont pas eu d'antécédents et ne sont supervisées.

les souris infectées en même temps avec la même dose d'un de ces cinq bacilles résistants étaient encore vivantes, sauf dans deux expériences où quelques souris sont mortes rapidement d'une infection intercurrente.

Parfois (souches Ba, Ravenel-résistant, Vallée-résistant), nous avons arrêté l'expérience à ce moment ou quelques jours après en sacrifiant les animaux survivants, renonçant à savoir quelle aurait été finalement la prolongation de la vie chez les animaux infectés avec le bacille résistant. Nous avons toujours dans ce cas trouvé des lésions très atténuées, faites de petits nodules grisâtres espacés sur un fond de parenchyme sain, bien différentes des lésions miliaries subintrales avec lesquelles les témoins

TABLEAU III.

Souche	Nombre de bacilles :	Nombre de colonies par goutte de			Nombre de :
	ou de groupes de :	0,005 ml de suspension de rate diluée :			bacilles :
	bacilles inoculés :	par rate :			
	à chaque souris :	0	1/10	1/100	(*)
Ravenel :	180	∞ , ∞	54 , 65	12 , 8	797.750
sensible :		∞ , ∞	34 , 1	3 , 4	262.500
		∞ , ∞	103 , 65	6 , 11	840.000
		∞ , ∞	37 , 129	11 , 13	1.015.000
Ravenel :	206	68 , 66	0 , 1	0 , 0	38.000
résistant :		50-100 , 50-100	3 , 15	0 , 0	82.000
		58 , 70-100	15 , 16	0 , 2	110.000
		1 , 0	0 , 0	0 , 0	2.500

(*) Pour chaque souris, moyenne des colonies comptées sur quatre gouttes, où des numérations ont pu être faites \times dilution de la rate (1/5) \times nombre d'oses par centimètre cube (200).

étaient morts. Cette différence est particulièrement significative pour les deux souches rendues résistantes au laboratoire, qui ne différaient des bacilles sensibles étudiés comparativement que par ce fait d'être des mutants résistants sélectionnés.

Dans d'autres expériences, nous avons laissé survivre plus longtemps les animaux inoculés avec des bacilles résistants (Bi, E.). La prolongation de la vie est alors encore plus frappante. Par contre l'atténuation des lésions l'est moins : ayant eu le temps d'évoluer davantage elles sont devenues aussi intenses, ou presque, que celles avec lesquelles les témoins étaient morts.

Et en effet, qu'elles aient été très intenses quand les animaux avaient été sacrifiés tard, ou plus discrètes quand ils avaient été sacrifiés tôt, dans tous les cas il existait des lésions tuberculeuses généralisées. Pour être nette, cette diminution de virulence pour la souris n'est donc tout de même que relative. Le BCG, même après une injection aussi massive, ne donne pas de lésions viscérales aux souris, comme le rappelait fort justement Noël Rist [9].

2° En outre l'une des 6 souches résistantes que nous avons étudiées (Leq.) s'est montrée à peu près aussi virulente pour la souris que les souches sensibles. Lorsque le dernier témoin est mort, 10 souris sur 14 qui avaient reçu ce bacille étaient mortes elles aussi, et les dernières n'ont pas tardé, si bien que la vie moyenne a été de 31,4 jours (limites de confiance : 28,5 à 34,5), très comparable à celle des témoins (26,6 ; de 24,6 à 28,7). Les lésions étaient à peine moindres.

3° Nous avons étudié à nouveau la sensibilité à l'isoniazide des bacilles qui se trouvaient dans les lésions pulmonaires des souris ayant reçu ces bacilles résistants (pour un seul bacille, Vallée-résistant, cette étude n'a pas été faite). Dans tous les cas sauf un, ces bacilles ont été trouvés hautement résistants, autant que la souche injectée ou seulement légèrement moins. Donc des bacilles très résistants étaient responsables de lésions moins vite évolutives qu'il n'est habituel, sans doute, mais de lésions tuberculeuses généralisées. D'autre part, il est frappant de voir que le seul cas où la résistance des bacilles avait franchement diminué dans les lésions (1 à 5 mcg/ml au lieu de 50 à 100) est justement celui où nous n'avions pas trouvé de diminution nette de la virulence. Cette souche n'avait pas été passée par un milieu contenant de l'isoniazide pour en éliminer les individus sensibles ; il est donc probable qu'elle était très hétérogène et que ce sont les bacilles les plus sensibles qu'elle contenait qui ont été responsables des lésions les plus rapidement évolutives.

4° Enfin il semble bien que la souche Ravenel-résistante, dont la virulence était si nettement atténuée, soit redevenue beaucoup plus virulente après un premier passage par la souris, sans redevenir pour cela moins résistante à l'isoniazide.

Le schéma 1 indique l'ensemble des expériences faites sur cette souche Ravenel ; les résultats détaillés des expériences de virulence se trouvent au tableau II.

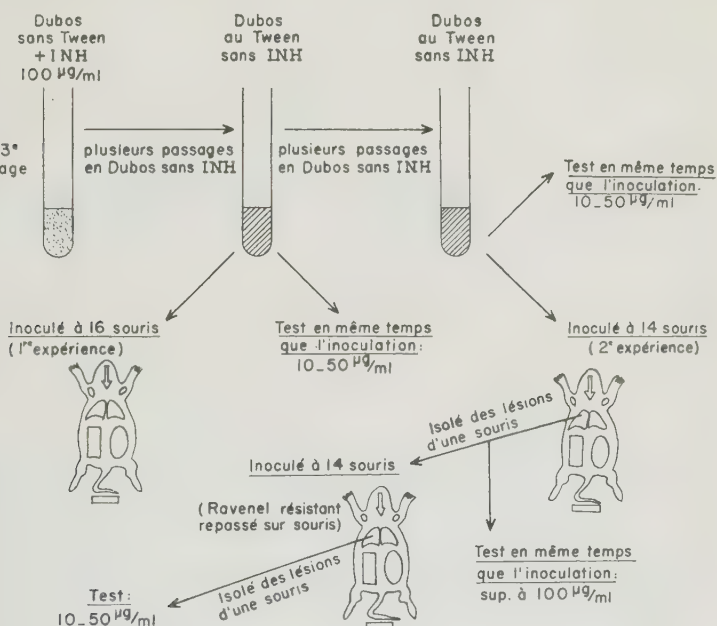
Deux expériences successives, faites sur deux repiquages de cette même souche Ravenel-résistante, avaient montré l'atténuation de sa virulence.

Dans la première, aucun animal n'était mort à la date où le dernier témoin était mort ; sacrifiées trois jours après, les souris présentaient des lésions très atténuées.

Dans la deuxième expérience, on avait laissé survivre beaucoup plus longtemps les animaux ; on ne les avait sacrifiés qu'au bout de soixante-quinze jours. A cette date, trois seulement avaient succombé et sans doute à une infection intercurrente, alors que tous les témoins étaient morts au bout de vingt-cinq jours, avec une survie moyenne de 17,5 jours (14,8 à 20,6). Sacrifiés au bout de soixante-quinze jours les animaux présentaient des lésions importantes. Le bacille isolé des lésions de

l'un d'eux était résistant à plus de 100 mcg/ml. C'est ce bacille qui fut injecté à 14 nouvelles souris pour une nouvelle étude de virulence.

Ce bacille, toujours aussi résistant, se montra nettement plus virulent. Sans doute, le jour de la mort des derniers témoins, deux animaux seulement étaient morts parmi ceux qui avaient reçu Ravenel-résistant. Mais il faut remarquer que les animaux témoins avaient succombé particulièrement vite (douze à vingt-



SCHEMA I.

vingt jours) avec cette souche Ravenel sensible qui venait, elle aussi, d'être repassée sur souris. Et surtout les animaux qui avaient reçu cette souche Ravenel-résistante repassée sur souris moururent, un peu plus tard sans doute, mais tout de même bien rapidement, comme en témoigne le détail des dates de mort : 24, 24, 26, 27, 27, 30, 32, 37, 45, 46, 51, 53, 58, 75 jours. Nous sommes loin des résultats obtenus avec la même souche avant ce premier passage par la souris où au bout de soixante-quinze jours, avec une inoculation comparable, aucun animal n'était mort de tuberculose.

Or les bacilles isolés des lésions d'une de ces dernières souris se sont montrés toujours aussi résistants : ils se multipliaient en présence de 100 et 500 mcg/ml.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

1° Sur 4 souches isolées chez des malades traités par l'isoniazide et trouvées très résistantes à ce médicament, 3 ont donné aux souris des lésions généralisées mais beaucoup moins rapidement évolutives que celles provoquées par des souches sensibles. Ces lésions contenaient des bacilles ayant conservé, ou à peu près, leur résistance initiale à l'isoniazide.

Il en a été de même avec 2 souches rendues résistantes à l'isoniazide *in vitro* et comparées avec les mêmes souches restées sensibles.

2° Au contraire, un bacille très résistant isolé chez une malade traitée par l'isoniazide a donné aux souris une tuberculose presque aussi aigue que celle des animaux témoins. Les lésions contenaient des bacilles moins résistants que les bacilles injectés. La souche dont on s'était servi était probablement hétérogène.

3° Enfin une souche résistante, de virulence atténuée, a vu sa virulence très nettement exaltée par un passage sur la souris, ceci sans diminution de sa résistance à l'isoniazide.

Ainsi une épreuve même aussi sévère que l'inoculation intraveineuse massive à la souris confirme que les bacilles résistants à l'isoniazide sont souvent moins virulents que les autres. Ce fait inattendu est une bonne nouvelle, qui doit encourager à traiter *larga manu* les tuberculeux pulmonaires.

Il est pourtant loin d'être entièrement rassurant, car :

beaucoup de souches dites résistantes à l'isoniazide sont en réalité un mélange de bacilles résistants et sensibles ;

les souches résistantes, même les plus homogènes, conservent un degré appréciable de virulence ;

il semble que certaines circonstances (comme le passage par l'animal) puissent exalter à nouveau la virulence sans faire perdre la résistance ;

enfin la virulence est variable d'un espèce à l'autre et nous ignorons encore ce qu'elle est pour l'homme.

Seuls des tests de sensibilité très nombreux, pratiqués sur des bacilles isolés chez des enfants récemment contaminés, pourront nous dire, maintenant que beaucoup de tuberculeux expectorent des bacilles résistants à l'isoniazide, si vraiment ils ne représentent plus un danger pour leur entourage. Sans doute, on n'a pas encore publié de cas de primo-infection ou de méningite à bacilles résistants d'emblée à l'isoniazide, mais les tests sur des bacilles de primo-infection sont encore beaucoup trop peu nombreux depuis que l'isoniazide s'est répandu pour que cette constatation ait jusqu'ici aucune valeur statistique, et il est fort à craindre que nous n'apprenions un jour ou l'autre de la façon la plus directe la virulence de ces bacilles pour l'homme. Déjà les observations se multiplient, plus difficiles à interpréter, mais peu rassurantes,

de malades qui sont morts ou dont l'état s'est aggravé alors qu'ils hébergeaient des bacilles résistants à l'isoniazide [6, 17].

Il est malheureusement très probable que nous verrons des tuberculoses à bacilles résistants d'emblée à l'isoniazide, comme nous en avons vues à bacilles résistants à la streptomycine, et il paraît très fâcheux, sur la foi de résultats partiels d'expériences de laboratoire, de relâcher les précautions que l'on connaît : emploi de plusieurs médicaments associés et séparation des malades d'avec les sujets anergiques.

Ce travail a été exécuté avec la collaboration de M^{lles} Solange Berteaux et Monique Deslandes. Nous tenons à remercier ici le Dr R. J. Dubos, du Rockefeller Institute, qui nous a fourni une des souches de souris qu'il emploie lui-même pour ses expériences et la souche de bacilles bovins Vallée qu'il a entraînée sur souris, ainsi que M. W. Steenken Jr. qui nous a envoyé la souche bovine Ravenel. Nous remercions aussi le Dr P. Jacob qui nous a procuré des bacilles tuberculeux résistants à l'isoniazide isolés chez des malades du Centre hospitalier Emile-Roux, à Brévannes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] W. H. FELDMAN, A. G. KARLSON et H. C. HINSHAW. *Amer. Rev. Tub.*, 1948, **57**, 162.
- [2] *Trans. 11th Conf. on the Chemotherapy of Tuberculosis, Vet. Ass.*, 1952.
- [3] C. CURCI et V. NITTI. *Arch. Tisiol.*, 1952, **7**, 927.
- [4] V. C. BARRY, M. L. CONALTY et E. GAFFNEY. *Lancet*, 1953, **244**, 978.
- [5] L. R. PEIZER et coll. *Amer. Rev. Tub.*, 1953, **68**, 290.
- [6] G. MIDDLEBROOK et M. L. COHN. *Science*, 1953, **118**, 297.
- [7] V. NITTI et coll. *Comm. XI^e Congrès italien Phthis.* Turin, octobre 1953 (cité par N. RIST [9]).
- [8] W. STEEKEN Jr. et E. WOLINSKY. *Amer. Rev. Tub.*, 1953, **68**, 548.
- [9] N. RIST, F. GRUMBACH et C. LIBERMANN. *Gaz. Med.*, 1954, **61**, 191.
- [10] W. C. MORSE et coll. *Amer. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 464.
- [11] M. BARNETT, S. R. M. BUSHBY et D. A. MITCHISON. *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 568.
- [12] G. MEISSNER. *Beitr. Klin. Tuberk.*, 1953, **110**, 219 et 1954, **110**, 538.
- [13] D. A. MITCHISON. *Brit. med. J.*, 1954, 128.
- [14] A. G. KARLSON et Y. IKEMI. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.*, 1952, **27**, 373.
- [15] G. A. NIGOGHOSSIAN. *Schweiz. med. Wschr.*, 1953, **18**, 432.
- [16] J. HIRSCH. *Naturwiss.*, 1952, **39**, 525.
- [17] H. BLOCH, D. WIDELock et L. R. PEIZER. *Amer. Rev. Tub.*, 1953, **68**, 734.
- [18] J. T. LITCHFIELD Jr. *J. Pharm. exp. Ther.*, 1949, **97**, 399.
- [19] C. H. PIERCE, R. J. DUBOS et W. B. SCHAEFER. *J. exp. Med.*, 1953, **97**, 189.

Depuis la rédaction de ce travail a paru une importante communication sur ce sujet de MM. Ch. Gernez-Rieux et coll. (Soc. Franç. Tuberc., séance du 11 décembre 1954).

ÉTUDE COMPARATIVE DU POUVOIR ANTITOXIQUE DE LA CORTISONE ET DE LA CHLORPROMAZINE

par L. CHEDID et F. BOYER.

(*Collège de France, Laboratoire d'Endocrinologie,
Institut Pasteur, Chimie thérapeutique B.*)

A côté des remarquables résultats obtenus au cours du traitement des toxi-infections (et notamment des salmonelloses), la médication anti-bactérienne peut dans quelques cas être inefficace et provoquer des accidents toxiques.

Parmi les différents produits antitoxiques essayés, deux ont retenu l'attention des médecins : la cortisone ou composé E et la chlorpromazine (4560 RP) ou largactil.

Le composé E a été utilisé avec succès au cours de la typhoïde humaine [4, 2, 3] et le largactil dans les neuro-toxicoses du nourrisson [4, 5]. Nous rapportons ici des résultats obtenus au laboratoire avec ces deux produits essayés comparativement.

Nous avons montré par ailleurs que la cortisone protège la souris contre des doses mortelles d'endotoxine [6, 7, 8], mais qu'elle est sans effet contre les toxines tétanique, diphtérique et de *Shigella dysenteriae* [9]. Ces résultats ont été confirmés depuis par différents auteurs [10, 11, 12, 13]. De même, il a été signalé que la chlorpromazine a une action anti-endotoxique certaine, mais est inefficace vis-à-vis des exotoxines essayées [14, 15].

Récemment, Reilly, Compagnon, Tournier et du Buit [16] ont noté que la cortisone ne protège pas le cobaye contre l'intoxication typhique, que l'endotoxine soit injectée sous forme d'antigène glucido-lipidique ou libérée dans l'organisme au cours du collapsus chloromycétique expérimental.

ACTION DE LA CORTISONE CHEZ LE COBAYE.

L'un de nous a constaté que des cobayes recevant l'endotoxine typhique, selon la technique de Reilly (dans le ganglion mésentérique), n'étaient pas protégés par la cortisone, même à forte dose. Par contre, cette hormone conserve son pouvoir anti-

(*) Manuscrit reçu le 25 novembre 1954.

toxique chez des rats ayant reçu la même endotoxine, au contact de leur système sympathique (dans le ganglion iléo-cæcal).

Dans l'expérience suivante, nous avons injecté par voie intrapéritonéale, à des cobayes de 300 g environ, 2 mg d'antigène glucido-lipidique extrait de *Salmonella typhi* (souche ty II) par la méthode de Boivin. La cortisone a été administrée par voie sous-cutanée une heure avant l'antigène.

Sur 10 cobayes témoins (non traités), 8 meurent en moins de seize heures.

Sur 8 cobayes traités (12,5 mg de cortisone), 8 meurent en moins de seize heures.

Sur 4 cobayes traités (25 mg de cortisone), 4 meurent en moins de seize heures.

Tous ces résultats montrent que la cortisone n'a aucune action antitoxique chez le cobaye. Ces faits sont à rapprocher des observations faites par Malkiel, et par Germuth et ses collaborateurs [47, 48]. Ces auteurs ont constaté que la cortisone, ainsi que l'ACTH, ne s'opposent pas au choc anaphylactique chez le cobaye et ne le protègent pas contre des doses mortelles d'histamine.

Rappelons que l'action anti-endotoxique du composé E a été mise en évidence chez le rat, le lapin, la souris et l'homme. Il est remarquable de constater que le composé E ne représente que 0 à 2 p. 100 des hormones surrénaliennes circulant chez le rat et le lapin, alors que chez le cobaye il représente 33 p. 100 [49].

Il semble donc que plusieurs communications concernant l'inefficacité de la cortisone à modifier la résistance de l'hôte à différents germes soient à reconsidérer lorsque les expériences ont été faites chez le cobaye.

Après avoir remarqué cette différence d'action inhérente à l'espèce animale, nous avons poursuivi l'étude comparative des deux produits chez la souris.

MODE D'ADMINISTRATION DE LA CORTISONE ET DE LA CHLORPROMAZINE. ACTIVITÉ CHEZ LA SOURIS SURRÉNALECTOMISÉE.

Dans le mémoire précité [46], Reilly et ses collaborateurs insistent sur le fait qu'il est nécessaire, pour obtenir un résultat favorable, d'injecter le ganglioplégique trente minutes avant l'endotoxine. Administré en même temps que l'endotoxine, ce produit hâte la mort des animaux. Nos expériences confirment ces résultats.

En ce qui concerne la cortisone, l'action la meilleure est obtenue en l'injectant une heure avant le poison microbien. On observe toutefois une protection marquée quand on l'administre en même temps que l'endotoxine. Par contre, d'après Jawetz [42],

si on l'emploie une heure après, son action est nulle tandis que pour Spinks, qui utilise une endotoxine extraite de *Brucella*, elle conserve son efficacité [41].

Ces conditions d'administration étant respectées, la cortisone et la chlorpromazine ont le pouvoir commun de protéger la souris contre des doses mortelles d'endotoxines et d'être sans effet contre les exotoxines.

De plus, l'un de nous a montré qu'après vaccination antioque-lucheuse, la résistance de la souris à l'endotoxine est considérablement abaissée et que ce fait ne semble pas lié à un mécanisme hypophyso-surrénalien. Chez les souris ainsi préparées, la cortisone comme la chlorpromazine perdent leur pouvoir anti-endotoxique [20].

A côté de ces points communs, plusieurs caractères différencient ces deux produits.

Les premières observations de l'action anti-endotoxique des gluco-corticoides ont été faites chez le rat et la souris surrénalectomisés [21, 22]. Chez ces animaux, en effet, cette action antitoxique est particulièrement nette. Nous avons vu qu'au contraire, la chlorpromazine ne protège pas la souris surrénalectomisée [23]. Les résultats des expériences résumés dans le tableau I montrent que dans ce cas de faibles doses de cortisone ne remplacent pas la surrénale absente et qu'il n'existe pas de synergie d'action de la cortisone et de la chlorpromazine tant chez la souris normale que chez la souris surrénalectomisée.

La protection fugace conférée par la chlorpromazine durant les premières heures ne semble pas spécifique. On l'obtient aussi en injectant du phénergan ou du nembutal [23]. Elle n'est en tout cas pas comparable à ce que l'on observe lorsque le produit est injecté à des souris ayant leurs surrénales intactes.

★
★

Au cours de l'hyperthermie provoquée chez la souris, la cortisone conserve son action anti-endotoxique, alors que la chlorpromazine est inactive.

Le collapsus chloromycétinique est difficile à réaliser expérimentalement. Reilly et ses collaborateurs le provoquent en injectant directement les bacilles typhiques dans le ganglion mésentérique du cobaye, puis en faisant ingérer à celui-ci de fortes doses de chloramphénicol [24]. De notre côté, nous l'avons obtenu en administrant cet antibiotique à des rats infectés avec *Salmonella enteritidis* (var. Danysz) et préalablement surrénalectomisés [25]. Dans ces conditions, les rats succombent en quelques heures, probablement sous l'action de l'endotoxine libérée par les germes, et il est possible de les protéger en leur injectant de la cortisone en même temps que l'antibiotique. Cette technique

à cependant l'inconvénient de provoquer un traumatisme important chez ces animaux malades et on enregistre de ce fait une mortalité post-opératoire très élevée. Nous avons mis au point une méthode qui diminue sensiblement la résistance des souris à divers agents microbiens ainsi qu'à divers poisons [26].

Cette méthode très simple consiste à maintenir les souris à une température de 37° (1) pendant huit heures.

TABLEAU I.

Surrénalectomisés	Dose d'endotoxine	Traitement	Survie				
			4 heures	8 heures	16 heures	2 jours	6 jours
d°	0,2mg	Témoins	(*) 13/51	3/51	0/51		
d°	d°	4560RP (a)	17/21	13/21	0/21		
d°	d°	C1 (b)	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
d°	d°	C2 (c)	17/23	4/23	0/23		
d°	d°	4560RP + C2	18/22	14/22	3/22	0/22	
Normaux	0,2mg	Témoins	-	-	4/10	3/10	3/10
d°	d°	4560 RP	-	-	7/10	6/10	5/10
Normaux	0,5mg	Témoins	-	-	6/56	4/56	3/56
d°	d°	4560 RP	-	-	32/58	20/58	18/58
d°	d°	C 1	-	-	20/40	20/40	15/40
d°	d°	C 2	-	-	2/10	2/10	0/10
d°	d°	4560R + C1	-	-	10/20	7/20	7/20
d°	d°	4560RP + C2	-	-	9/20	6/20	6/20

(*) Nombre de survivants/Nombre du lot.

(a) Le 4560 RP est toujours injecté à la dose de 5 mg/kg trente minutes avant l'endotoxine.

(b) C1 = 2 mg de cortisone injectés une heure avant l'endotoxine.

(c) C2 = 0,05 mg de cortisone injecté la veille, une heure avant et deux heures après l'endotoxine.

EXPÉRIENCES. — Des souris normales de 20 g environ sont infectées par voie buccale avec *S. enteritidis* var. Danysz (environ 1 000 000 000 de germes ; à cette dose, toutes les souris succombent entre le cinquième et le douzième jour). Le quatrième jour après l'infection, ces animaux sont répartis en 6 lots :

Le premier lot sert de témoin et est laissé à 23°.

(1) Nous avons utilisé, pour ces expériences, une chambre-étuve de 1,80 x 1,60 x 2,20 m. Dans ces conditions, des souris normales, après un séjour de dix heures, ne présentent aucun trouble apparent.

Le deuxième lot reçoit par voie buccale 20 mg de chloramphénicol et est laissé à 23°.

Le troisième lot sert de témoin à 37°.

Le quatrième lot reçoit la même dose de chloramphénicol et est placé à 37° une heure après.

Le cinquième lot reçoit, en plus du chloramphénicol, 2 mg de

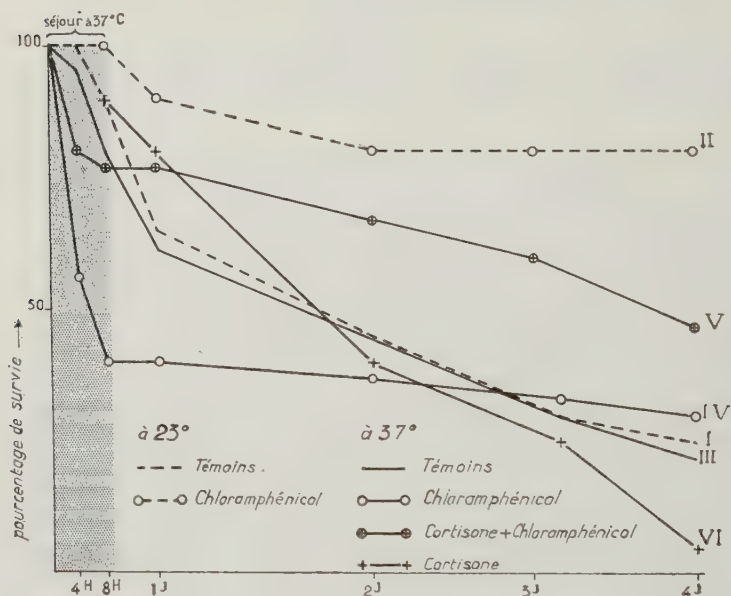


FIG. 1.

cortisone par voie sous-cutanée et est également mis à 37° une heure après.

Le sixième lot reçoit 2 mg de cortisone et est placé à 37° une heure après.

La figure 1 rend compte des résultats au quatrième jour de l'expérience.

De l'examen de ces courbes (dont chacune représente 50 souris), il ressort que :

1° 20 mg de chloramphénicol protègent les souris d'une façon marquée pendant quatre jours à 23° (courbe II) ;

2° Cette même dose d'antibiotique provoque un collapsus mortel pour une grande partie des animaux, dans les huit premières heures à 37° et protège les survivants par la suite (courbe IV) ;

3° 2 mg de cortisone administrés en même temps que le

chloramphénicol évite le collapsus chez la plupart des animaux (courbe V) ;

4° La cortisone seule protège les animaux pendant les premières heures, mais la résistance de ceux-ci semble être diminuée par la suite (courbe VI).

Il semble donc qu'un séjour à 37° rende la souris plus sensible à l'endotoxine libérée sous l'action du chloramphénicol.

Les expériences suivantes confirment cette hypothèse.

Nous avons tout d'abord comparé la sensibilité de la souris à l'endotoxine extraite de *S. enteritidis*, à la température du laboratoire (23°) et à l'étuve (37°).

A la température du laboratoire, la dose 100 p. 100 mortelle en vingt-quatre heures est de 0,5 mg d'antigène (par voie intrapéritonéale) tandis qu'un séjour de quelques heures à 37° permet d'abaisser cette dose de vingt fois.

Dans l'expérience suivante, 60 souris de 20 g environ ont reçu dans la cavité péritonéale, 0,1 mg d'endotoxine ; à 20 de ces animaux, nous avons administré, une heure avant, 2 mg de cortisone par voie sous-cutanée ; à 20 autres, 0,125 mg de chlorpromazine une demi-heure avant ; les 20 derniers non traités ont servi de témoins.

Tous les animaux ont été placés à 37° dès l'injection d'endotoxine et maintenus à cette température pendant quatre heures, puis ramenés dans une pièce à 23°.

RÉSULTATS. — Les 20 souris témoins sont mortes entre la première et la seizième heure. Les 20 animaux ayant reçu la chlorpromazine ont succombé en deux heures, 40 p. 100 des souris traitées avec la cortisone vivaient encore le quatrième jour.

Les 20 souris témoins sont mortes entre la première et la seizième heure. Les 20 animaux ayant reçu la chlorpromazine ont succombé en deux heures, 40 p. 100 des souris traitées avec la cortisone vivaient encore le quatrième jour.

Ces expériences montrent que la sensibilité de la souris (2) à l'endotoxine est considérablement abaissée lorsqu'on maintient cet animal à 37°, que la cortisone conserve son action antitoxique à cette température, mais que, par contre, la chlorpromazine n'a pas d'action protectrice, bien au contraire, elle hâte la mort des animaux (3).

« La souris est à l'extrême limite de l'homéothermie ; la pré-

(2) Notons que cette augmentation de la sensibilité à l'endotoxine se fait à un degré beaucoup moindre chez le rat : la dose 100 p. 100 mortelle est voisine de celle qui le tue à la température ordinaire.

(3) Des souris normales à 37° ont très bien toléré cette dose de chlorpromazine pendant seize heures.

cision et la régularité de ses mécanismes thermo-régulateurs sont loin d'être parfaites » (L. Chevillard [27]).

A 23° de température ambiante, la température rectale des souris qui nous ont servi de témoins est en moyenne de 37°6. Après un séjour à l'étuve, ces souris sont en hyperthermie (39°5 de moyenne après une heure et 40°1 après cinq heures).

Les souris ayant reçu de la cortisone (sans endotoxine) ont une température de 37°1 avant d'être placées à l'étuve et, après un séjour d'une heure, ont 39° de moyenne (l'hormone ne semble pas exercer son effet antipyrétique dans les conditions de notre expérience).

Le lot ayant reçu la chlorpromazine trente minutes auparavant est en hypothermie (35°) avant d'être placé à l'étuve, mais le « ganglioplégique » ne s'oppose pas à l'élévation de la température centrale, puisqu'après une heure à l'étuve, la moyenne des lectures est de 39°7.

Quel qu'en soit le mécanisme, cette augmentation de la sensibilité de la souris sous l'influence de la chaleur peut s'observer avec d'autres poisons. Elle est particulièrement nette à l'égard de l'histamine, comme nous venons de le signaler. De plus, dans ce cas, les antihistaminiques s'opposent à la toxicité sans toutefois combattre l'hyperthermie [26].

INFLUENCE DE LA CHALEUR SUR LA SENSIBILITÉ DE LA SOURIS AUX EXOTOXINES.

Les résultats enregistrés avec l'endotoxine chez des souris à 37°, nous ont amenés à rechercher leur comportement vis-à-vis des toxines tétanique et diphtérique, lorsqu'on les maintient à cette température.

La toxine tétanique a été injectée par voie intramusculaire (cuisse) à deux lots de 10 souris de 20 g. Le lot mis à 37° dès l'injection de toxine s'est comporté exactement comme le lot laissé à 23°. *Malgré un séjour de vingt heures à cette température*, tous les animaux meurent en vingt-quatre et quarante-huit heures, comme les témoins.

En ce qui concerne la toxine diphtérique, les résultats sont différents. Voici l'une de nos expériences :

Quatre lots de 10 souris de 20 g reçoivent par voie sous-cutanée 22 unités de toxine diphtérique (4).

Deux de ces lots avaient été traités une heure avant avec 2 mg de cortisone par voie sous-cutanée. Un lot traité et un lot témoin sont placés à 37° pendant huit heures.

(4) Nous remercions le Dr Laffaille qui nous a fourni la toxine diphtérique nécessaire à la réalisation de ces expériences.

Les résultats représentés dans la figure 2 montrent que :

1° A 37°, les souris résistent moins bien à la toxine diphtérique qu'à 23°.

2° La cortisone, sans effet à 23°, rétablit la résistance de ces

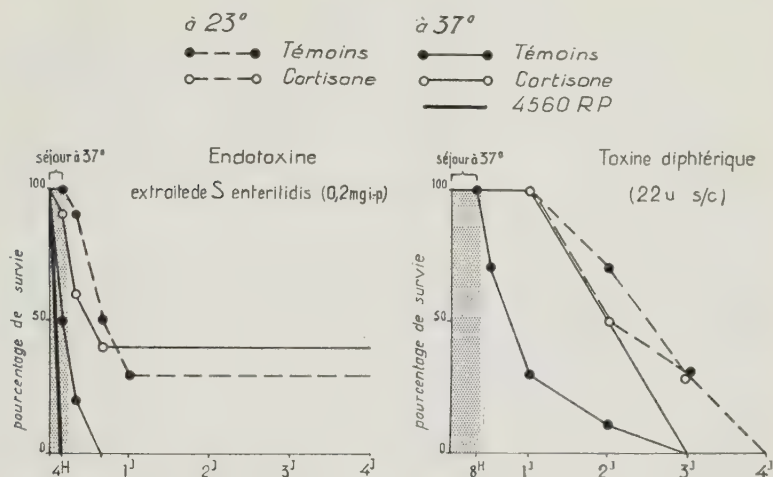


FIG. 2.

animaux à la toxine, de sorte que ceux-ci se comportent comme les témoins à 23°.

ACTION PRO-INFECTIEUSE DE LA CORTISONE ET DE LA CHLORPROMAZINE.

Nous savons qu'un traitement prolongé avec la cortisone rend les animaux plus sensibles à l'infection. Cette action déprimante est particulièrement nette chez le rat infecté avec *S. enteritidis* var. Danysz [8]. C'est donc cet animal que nous avons choisi pour étudier l'action de la chlorpromazine administrée dans les mêmes conditions que la cortisone.

RÉSULTATS. — 80 à 100 p. 100 des animaux infectés recevant une dose quotidienne de 2 mg de cortisone, pendant dix jours, meurent en quinze à vingt jours. Au contraire, 5 mg/kg de chlorpromazine par jour pendant dix jours n'ont pas augmenté la mortalité : les animaux traités ne succombent pas plus que les témoins.

DISCUSSION.

Lewis et ses collaborateurs viennent de signaler l'action favorable des gluco-corticoïdes vis-à-vis du tétanos, à condition que

ceux-ci soient administrés par voie buccale [28]. Les résultats que nous avons consignés ici montrent d'autre part une survie significative des souris traitées à la cortisone et ayant reçu de la toxine diphthérique, lorsqu'on provoque chez elles de l'hyperthermie. Néanmoins, l'action anti-toxique de l'hormone, injectée par voie parentérale et dans des conditions normales, semble limitée aux endotoxines. Il en va de même de la chlorpromazine [14, 15]. De plus, le pouvoir anti-endotoxique de ces deux produits disparaît au cours de la vaccination anti-coquelucheuse.

Tels sont les traits communs de ces produits qui diffèrent cependant sur bien d'autres points. C'est ainsi que la chlorpromazine [5] a le mérite d'être dénuée d'action pro-infectieuse même en administration prolongée.

Mais en dehors de cet avantage, son action anti-endotoxique semble étroitement conditionnée par un certain nombre de facteurs, de sorte qu'elle n'agit plus dans des cas où l'action de la cortisone se maintient. C'est ainsi que son pouvoir protecteur disparaît en l'absence de la surrénale, même si l'on injecte en même temps de faibles doses de cortisone. La chlorpromazine, cependant, est anti-toxique en l'absence d'hypercorticisme.

En effet, sans bloquer totalement la sécrétion d'ACTH, il semble néanmoins qu'elle diminue la sensibilité de l'hypophyse au stress [30, 31, 32]. Il serait utile de rechercher si l'on peut compenser la surrénalectomie en associant au ganglioplégique d'autres hormones corticales.

Par ailleurs, la chlorpromazine perd son activité anti-endotoxique au cours de l'hyperthermie provoquée par une élévation de la température ambiante. Dans le travail précédemment cité, Reilly écrit : « Les cobayes traités par la chlorpromazine, puis intoxiqués, ont d'autant plus de chances d'être protégés et de se remettre rapidement que l'on modère leur abaissement thermique. » Il semble donc que l'action de ce produit ne se manifeste qu'à l'intérieur de certaines limites fixes de température, tandis que l'action de la cortisone persiste au cours de ces variations thermiques.

A ce propos, notons, en accord avec Ph. Decourt [31] que le 4560 RP ne transforme pas les animaux en poïkilothermes, lesquels tendent à égaliser leur température centrale avec la température ambiante. Néanmoins, et à la différence de ce que ces auteurs ont constaté chez le cobaye, nous voyons disparaître l'effet hypothermisant du produit ; mais il s'agit de la souris et de mesures faites après une ou deux heures. Signalons enfin que

(5) Il est à noter que ce produit est un dérivé chimique de la prométhazine (phénergan), laquelle est capable de provoquer des infections généralisées à germes non pathogènes [29].

Willems et Laborit ont trouvé aussi « une hyperthermie au chaud sous largactil » [34].

Ces considérations indiquent que malgré les nombreuses analogies qui existent entre ces deux produits (en plus de celles que nous venons d'énumérer, rappelons qu'ils s'opposent tous deux à la division des œufs d'oursin *in vitro* [35, 36]), il demeure des divergences fondamentales. Aussi, dans la mesure où cette comparaison permet de dégager les limites réciproques d'action de ces deux médicaments, elle peut donner lieu à leur meilleure utilisation.

RÉSUMÉ.

1° L'activité anti-endotoxique de la cortisone ne se manifeste pas chez le cobaye.

2° Il est possible d'abaisser considérablement la résistance de la souris à certains agents microbiens en la maintenant à l'étuve (37°) pendant quelques heures. Nous avons pu ainsi étudier certains phénomènes tels que le collapsus chloromycétinique.

3° L'étude comparative de l'activité de la cortisone et de la chlorpromazine nous permet de rapporter les différences suivantes :

a) A 37°, la cortisone conserve son activité anti-endotoxique. Par contre, à cette température, la chlorpromazine ne protège plus les animaux.

b) La cortisone protège la souris surrénalectomisée contre des doses mortelles d'endotoxine. Dans ces conditions, la chlorpromazine est inactive.

c) Bien que plus efficace quand elle est injectée une heure avant l'endotoxine, la cortisone injectée en même temps protège encore l'animal. La chlorpromazine dans les mêmes conditions hâte au contraire la mort de celui-ci. Son action protectrice ne s'exerce que si elle est injectée au moins trente minutes avant l'antigène.

d) La cortisone, en traitement prolongé, diminue la résistance de l'organisme. La chlorpromazine dans ce cas est sans effet.

4° Ces deux produits ont comme points communs : a) de protéger des animaux (sauf le cobaye) contre des doses mortelles d'endotoxine et, b) de perdre cette activité anti-endotoxique chez des souris ayant reçu de fortes doses de vaccin anticoquelucheux.

5° Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'action synergique entre cette hormone et ce ganglioplégique, tant chez l'animal normal que chez l'animal surrénalectomisé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. E. SMADEL, H. L. LEY et F. H. DIRKS. *Ann. int. Med.*, 1951, 34, 1.

- [2] T. E. WOODWARD, H. E. HALL, R. D. RIVERA, J. A. HIGHTOWER, MARTINEZ et R. PARKER. *Ann. int. Med.*, 1951, **34**, 10.
- [3] P. DURAND et G. RENOUX. *Sem. Hôp.*, 1953, **52-53**, 2555.
- [4] P. CHEDID et A. FARJALLAH. *Journées médic. Fac. Fr. Méd. Beyrouth*, 1952.
- [5] A. FARJALLAH. *Thèse de Médecine*, 1952, Beyrouth, Liban.
- [6] L. CHEDID, F. BOYER et M. SAVIARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 713.
- [7] L. CHEDID, F. BOYER et M. SAVIARD. *Ces Annales*, 1952, **83**, 213.
- [8] L. CHEDID, F. BOYER et M. SAVIARD. *Ces Annales*, 1954, **86**, 347.
- [9] F. BOYER et L. CHEDID. *Ces Annales*, 1953, **84**, 453.
- [10] A. DELAUNAY et J. LEBRUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1698.
- [11] W. W. SPINK et D. ANDERSON. *J. clin. Investig.*, 1954, **33**, 540.
- [12] P. GELIER, E. R. MILLER et E. JAWETZ. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **86**, 716.
- [13] L. THOMAS et R. T. SMITH. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1954, **86**, 810.
- [14] J. REILLY et P. TOURNIER. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1953, **137**, 385.
- [15] R. MARAL. *VI^e Congrès Intern. Microbiol.*, Rome, 1953, **1**, 192.
- [16] J. REILLY, A. COMPAGNON, P. TOURNIER et H. DU BUIT. *Ann. Méd.*, 1954, **55**, 5.
- [17] S. MALKIEL. *J. Immunol.*, 1951, **66**, 379.
- [18] F. G. GERMUTH JR., B. OTTINGER et J. OYAMA. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **80**, 188.
- [19] A. K. DONE, R. S. ELY, R. B. RAILE et V. C. VELLE. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1952, **81**, 667.
- [20] L. CHEDID. *Ann. Endocr.*, 1954 (sous presse).
- [21] L. A. LEWIS et I. H. PAGE. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1949, **50**, 547.
- [22] A. DELAUNAY et J. LEBRUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **224**, 1669.
- [23] L. CHEDID. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1039.
- [24] J. REILLY, A. COMPAGNON, P. TOURNIER, R. BASTIN et H. DU BUIT. *Ann. Méd.*, 1950, **51**, 597.
- [25] L. CHEDID et F. BOYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **234**, 2108.
- [26] L. CHEDID et F. BOYER. *C. R. Soc. Biol.*, 1954 (sous presse).
- [27] L. CHEVILLARD. *Thèse de sciences*, Paris, 1935.
- [28] R. A. LEWIS, R. S. SATOSKAR, G. G. JOAG, B. T. DAVE et J. C. PATEL. *J. Am. med. Assoc.*, 1954, **156**, 479.
- [29] N. B. HALPERN, B. BENACERRAF, V. PEAN et J. A. SALVA. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 667.
- [30] E. ARON, Y. CHAMBON et A. VOISIN. *Bull. Acad. Méd.*, 1953, **137**, 417.
- [31] PH. DECOURT. *Thérapie*, 1954, 293.
- [32] J. CHEYMOL, J. DE LEEUW et J. OGER. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1213.
- [33] P. DECOURT, M. BRUNAUD et S. BRUNAUD. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1605.
- [34] H. LABORIT. *Thérapie*, 1954, **9**, 302.
- [35] MENKIN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 195.
- [36] P. DECOURT et G. ANGUERRA. *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **236**, 1445.

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ HÉRÉDITAIRE AU CO₂ CHEZ LA DROSOPHILE

I. — MULTIPLICATION DU VIRUS σ ET PASSAGE A LA DESCENDANCE APRÈS INOCULATION OU TRANSMISSION HÉRÉDITAIRE

par Nadine PLUS (*).

*(Laboratoire de Génétique formelle,
Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise.)*

INTRODUCTION.

La sensibilité au gaz carbonique chez la *Drosophile* est une anomalie physiologique qui n'est pas contagieuse et qui est transmise par hérédité indépendamment des chromosomes. Elle est caractérisée par une paralysie mortelle des insectes après narcose dans le CO₂ et ne s'accompagne, apparemment, d'aucun autre symptôme. La transmission régulière de la sensibilité par les femelles de certaines souches de drosophiles a fait considérer pendant longtemps ce phénomène comme un des rares exemples connus d'hérédité cytoplasmique chez les animaux. Ultérieurement, la découverte du pouvoir infectieux que possède la particule cytoplasmique l'a fait classer parmi les virus. En effet, quand elle est inoculée artificiellement à une mouche normale elle s'y multiplie ; cette multiplication entraîne, chez l'hôte, après un temps d'incubation, l'apparition des symptômes de la sensibilité au CO₂. La sensibilité ainsi acquise est même transmise par les femelles à une partie de leurs descendants. La nature exacte de l'agent particulaire responsable a fait l'objet de nombreuses discussions que l'on trouvera condensées dans deux revues consacrées à la sensibilité au CO₂ (L'Héritier, 1948 et 1951). La particule cytoplasmique sera simplement considérée ici comme un virus héréditaire et appelée virus σ .

Les propriétés particulières de ce virus permettent de l'introduire dans une drosophile de deux manières différentes : soit artificiellement par inoculation, soit naturellement par hérédité.

(*) Manuscrit reçu le 24 novembre 1954.

Les deux premiers chapitres de ce mémoire sont consacrés à l'étude de la multiplication du virus dans les drosophiles inoculées et à l'étude des modalités de sa transmission héréditaire par les femelles inoculées. Le troisième chapitre étudiera la cinétique de multiplication du virus chez les drosophiles des souches « pures sensibles » dont les femelles transmettent σ régulièrement comme un plasmagène.

Le rendement en virus des drosophiles a été déterminé sur des lots d'au moins 50 individus, soit par la classique méthode des dilutions, soit par la méthode de la période d'incubation. Cette dernière utilise la relation linéaire qui lie le temps d'incubation présenté par les mouches et le logarithme du nombre d'unités infectantes introduites. Cette relation a été établie une fois pour toutes en utilisant la méthode des dilutions progressives pour le calcul du titre (Plus, 1950). L'interprétation biologique de cette relation et la validité des hypothèses sur lesquelles repose la méthode des dilutions ont été discutées dans un précédent mémoire (Plus, 1954). Dans cette même publication sont exposées les techniques d'extraction du virus, d'inoculation des insectes et de détection de la sensibilité au CO_2 . Je rappellerai simplement que les drosophiles utilisées présentent un géno'type uniforme (souche Oregon R—C—) et sont élevées à 20° dans des conditions aussi identiques que possible.

CHAPITRE I

Etude de la multiplication du virus dans les drosophiles inoculées.

L'évolution du rendement en virus des drosophiles inoculées a été suivie en caractérisant les particules formées par le pouvoir infectieux qu'elles manifestent quand elles sont injectées dans un hôte résistant. Cette étude a été étendue aux différents stades de la vie de la drosophile.

I. — INOCULATION DES IMAGOS.

Voici le schéma des expériences réalisées avec les imagos. Deux à trois cents mouches résistantes, prises quarante-huit heures après l'émergence imaginale, sont inoculées avec une suspension virulente de titre connu. Des échantillons de ces insectes infectés, comprenant de 10 à 100 individus, sont ensuite prélevés à des intervalles de temps réguliers. Le rendement moyen en virus d'une mouche de chaque échantillon est déterminé selon la technique usuelle. Pour l'inoculation initiale, des suspensions de titres divers sont utilisées. Les prises d'échantillons sont fré-

quentes dans les premières heures qui suivent l'infection, puis espacées de deux en deux jours environ.

La figure 1 représente les résultats de trois expériences correspondant à l'inoculation chez les imago de 1, 1 000 et 13 000 unités infectantes. En abscisse est porté le temps qui sépare l'injection de la prise d'échantillon, en ordonnée le logarithme du rendement moyen d'une mouche en virus. Une unité est ajoutée à la valeur de ce rendement pour supprimer les logarithmes négatifs. Les trois courbes ont été tracées au jugé dans la région correspondant aux quatorze premiers jours. Ensuite, l'ordonnée des parties

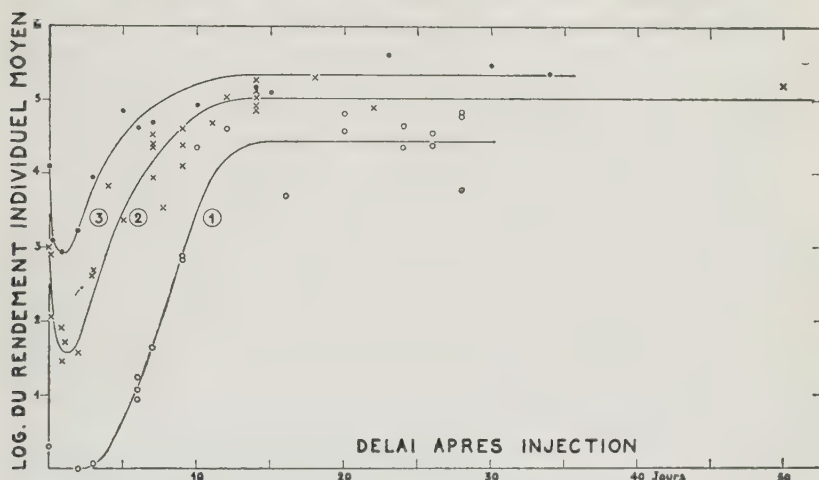


FIG. 1. — Variations au cours du temps du rendement moyen en virus d'une drosophile adulte inoculée avec des suspensions virulentes de titres divers : (1) 1 unité infectante, (2) 1.000 U.I., (3) 13 000 U.I.

horizontales a été déterminée en calculant, pour chaque expérience, la moyenne des logarithmes des différentes valeurs du rendement. On voit que, quel que soit le titre de l'inoculum initial, la marche de la multiplication comprend nettement trois étapes :

1° Une disparition rapide du nombre des particules virulentes introduites ;

2° Une augmentation brutale de la teneur en virus qui, en quarante-huit heures, atteint le niveau initial, puis le dépasse beaucoup ;

3° Une stabilisation du rendement à une valeur limite qui reste la même jusqu'à la mort de la mouche. Cette valeur varie avec le titre de l'inoculum initial. Alors qu'elle est de 36 000 environ, si l'infection a lieu à partir d'une particule virulente unique,

elle atteint 250 000 si la masse d'injection contient 13 000 particules.

Ces trois étapes sont classiquement celles que l'on observe lors de la multiplication des virus. Des courbes de même forme ont été obtenues avec le bactériophage (Ellis et Delbrück, 1939), le virus grippal (Henle, Henle et Rosenberg, 1947 ; Hoyle, 1948), celui de l'encéphalomyélite du cheval (Koprowski et Lennette, 1944 ; Dulbecco et Vogt, 1954), le virus de la poliomyélite (Scherer et Syverton, 1952) et d'autres encore.

La première étape doit correspondre à l'absorption du virus par les cellules de la mouche, à laquelle succède une phase d'éclipse qui est sans doute l'équivalent de la phase « végétative » du bactériophage. On voit que cette absorption procède lentement. Une expérience d'extraction de virus à partir de mouches fraîchement inoculées montre même que trois heures après injection tout le virus peut encore être récupéré sous forme virulente. Lors des inoculats massifs, l'absorption ne paraît pas être terminée quand commence la libération de nouveaux éléments virulents.

La seconde phase est une phase de multiplication exponentielle. En effet, les parties ascendantes des courbes sont approximativement des droites. Ces droites sont parallèles et décalées dans le temps d'un intervalle qui paraît croître comme le logarithme du nombre d'unités infectantes introduites dans la mouche. Ainsi une distance correspondant à cinq jours environ sépare les courbes 1 et 2, et une distance de deux jours et demi environ sépare les courbes 2 et 3.

La dernière phase de la multiplication est, nous l'avons vu, la persistance d'un rendement élevé en virus jusqu'à la mort naturelle de la mouche. On peut voir, sur la courbe 2, qu'un lot de drosophiles s'est montré aussi riche en virus cinquante jours après l'inoculation que trente-cinq jours auparavant. D'autre part, le niveau de ce plateau est d'autant plus élevé que l'inoculum initial est plus riche en virus.

Le tableau I montre les moyennes des logarithmes des rendements correspondant aux points d'abscisse supérieure à treize jours pour les courbes 1, 2 et 3 de la figure 1.

TABLEAU I. — Comparaison des moyennes des logarithmes du rendement correspondant aux plateaux des trois courbes de la figure 1.

	MOYENNE des log. du rendement	NOMBRE DE DEGRÉS de liberté	VALEUR du t de Student
Courbe 1 $\bar{x}_1 = 4,38 \pm 0,12$		9	} 3,87 pour 16 d. de l. (1) } 3,08 pour 11 d. de l. (2)
Courbe 2 $\bar{x}_2 = 5,02 \pm 0,06$		7	
Courbe 3 $\bar{x}_3 = 5,34 \pm 0,10$		4	

(1) soit une probabilité inférieure à 0,01.

(2) soit une probabilité de 0,01 environ.

Ces moyennes peuvent être comparées par la méthode statistique du *t* de Student. La différence entre les deux valeurs caractéristiques des plateaux 1 et 2 d'une part, et 2 et 3 d'autre part, est significative.

Cette existence d'un plateau final peut être interprétée, *a priori*, de deux façons différentes.

1° On peut penser qu'il s'agit d'une récolte unique de virus qui reste actif jusqu'à la mort de la mouche. Les cellules ayant émis des particules infectieuses seraient incapables d'en fournir une seconde fois. C'est ainsi que les bactéries infectées par des phages se lysent et émettent une unique récolte de bactériophages qui restent ensuite actifs dans le milieu de culture. En ce cas, le plateau final ne représenterait pas réellement une phase de multiplication, mais une phase de conservation du virus. Cette interprétation conduit à admettre que l'organisme de la drosophile ne fabrique pas d'anticorps. En fait, il ne semble pas exister, chez les Insectes, de phénomènes d'immunité semblables à ceux observés chez les Vertébrés.

2° On peut penser qu'un équilibre s'établit entre une production continue et une destruction des particules. Le plateau représenterait vraiment alors une phase de multiplication du virus. Il semble qu'un tel équilibre statistique s'établisse lors de l'infection de la membrane allantodienne de l'œuf par le virus grippal. En effet, d'une part, l'émission du virus par les cellules infectées est lente (Cairns, 1952) ou même continue dans certaines conditions (Henle, Liu et Finter, 1954), d'autre part, la survie des particules virulentes est courte (Horsfall, 1954). Dans le cas du virus σ aucun argument décisif ne permet, à l'heure actuelle, de choisir à coup sûr entre l'hypothèse de la récolte unique et celle de l'équilibre statistique. Néanmoins, la théorie de la récolte unique, surtout à l'échelle de la cellule, me paraît plus vraisemblable. Tout d'abord, elle permet d'expliquer les différences de niveau qui s'observent selon l'inoculat initial. En effet, si les cellules ne peuvent supporter qu'un seul cycle de multiplication du virus, celui qui est fourni par les premiers récepteurs infectés sera absorbé par les autres et, par conséquent, perdu pour le rendement final. Cette perte peut être importante dans deux cas :

1° Si la mouche contient un grand nombre de cellules réceptrices fournissant chacune un faible rendement en virus ;

2° Si les cellules qui s'infectent de proche en proche peuvent absorber plusieurs particules chacune sans que leur rendement en soit augmenté.

L'existence de la récolte unique est également suggérée, comme nous le verrons plus loin, par les faits relatifs à la transmission héréditaire du virus inoculé.

II. — INFECTION AU STADE LARVAIRE ET AU STADE D'ŒUF.

Cette étude de la multiplication de σ dans les drosophiles adultes peut être étendue aux autres stades de la vie de ces insectes. Une première expérience a été réalisée avec des larves qui ont été inoculées quelques heures avant la pupaison. Elles ont reçu en moyenne 300 unités infectantes. Cette expérience n'a pas pu être conduite sur une grande échelle, car l'inoculation des larves est une opération délicate et la mortalité post-opératoire est élevée. Les échantillons de pupes et de mouches prélevés ne comprenaient

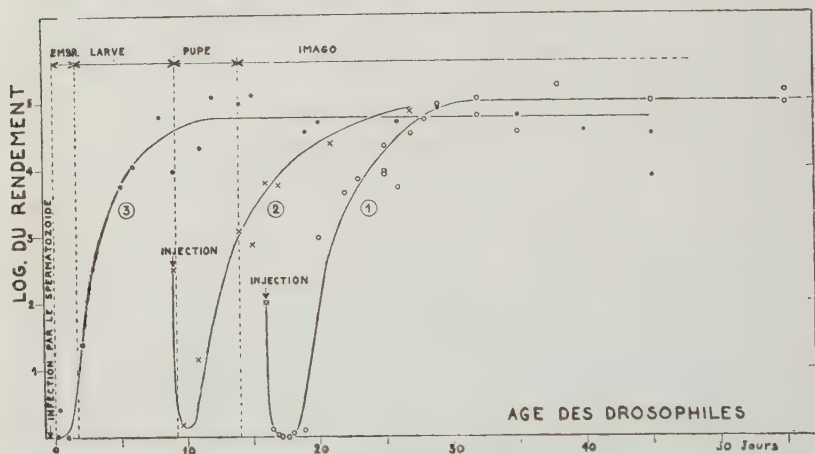


FIG. 2. — Variations au cours du temps du rendement moyen en virus d'une drosophile inoculée au stade imaginal (courbe 1), au stade larvaire (courbe 2), ou infectée à l'état d'œuf par le spermatozoïde paternel (courbe 3)

que 5 à 8 individus seulement. Les 8 valeurs du rendement individuel moyen obtenues ont permis de tracer la courbe 2 de la figure 2. Sur ce graphique, les ordonnées représentent, comme d'habitude, le logarithme du rendement individuel moyen au stade embryonnaire, larvaire ou imaginal ; les abscisses, par contre, représentent l'âge des drosophiles dont le rendement est déterminé. Le moment de l'inoculation est indiqué par une flèche verticale. Sur ce même graphique est figurée la courbe de multiplication de σ chez l'imago inoculé avec 100 unités infectantes (courbe 1). On voit, en comparant les courbes 1 et 2, que l'évolution du rendement chez la larve est tout à fait comparable à celle que l'on observe chez l'adulte. Le fait que la courbe 2 ne descende pas jusqu'à l'axe des abscisses, comme la courbe 1, provient simplement du plus grand nombre d'unités infectantes inoculé initialement. La marche de la multiplication du virus n'est

donc pas affectée par les remaniements intenses qui ont lieu pendant la période nymphale. On peut alors se demander si elle serait modifiée par la croissance embryonnaire et larvaire. Il est difficile d'inoculer des jeunes larves et encore plus difficile d'inoculer des œufs. Mais il se trouve que l'infection des œufs est réalisée naturellement chaque fois qu'un mâle d'une souche pure sensible est croisé à une femelle résistante. En effet, 75 p. 100 environ des descendants d'un tel croisement sont sensibles. J'ai donc étudié la multiplication du virus chez ces descendants de mère résistante et de père sensible. L'expérience a été réalisée de la façon suivante : une cinquantaine de jeunes mâles d'une souche Oregon sensible ont été croisés avec une centaine de femelles résistantes de même génotype. Quand la ponte est devenue active, les œufs ont été recueillis toutes les trois heures pendant deux jours. Le rendement individuel moyen de ces œufs, puis des larves, des pupes et des mouches a été déterminé au cours des quarante-cinq jours suivants. Les adultes ont été préalablement soumis au test du gaz carbonique ; 80 p. 100 d'entre eux se sont montrés sensibles. Il a été tenu compte de ce pourcentage dans la détermination du rendement des drosophiles des autres stades. Les résultats sont représentés sur la figure 2 par les cercles de la courbe 3. On voit que les œufs, à l'éclosion, ne contiennent pas de virus à l'état infectieux. Vingt-quatre heures après, avant la fin de la vie embryonnaire, commence la phase habituelle d'augmentation du rendement et elle se poursuit pendant la vie larvaire. Le rendement reste ensuite constant pendant les périodes nymphale et imaginale. Le niveau du plateau a été déterminé en calculant la moyenne des logarithmes des rendements correspondant aux points d'abscisse supérieure à douze jours. La valeur trouvée $4,61 \pm 0,11$ (erreur calculée sur 9 degrés de liberté) n'est pas significativement différente de celle calculée précédemment lors de l'inoculation d'une unité infectante aux imagos. Donc, chez ces mouches tenant la sensibilité de leur père, la marche de la multiplication du virus paraît se faire comme chez l'imago infectée avec quelques unités infectantes. La fécondation par le mâle réaliserait ainsi une véritable inoculation dans l'œuf vierge. En fait, le spermatozoïde n'amène, sans doute, qu'une seule particule dans l'ovule. Rappelons, en effet, qu'une fraction seulement des descendants d'un mâle sensible sont sensibles.

Cette étude de la multiplication du virus après inoculation dans la prépupe et après pénétration dans l'œuf montre que le comportement du virus est indépendant des stades de la vie de l'hôte. Ces résultats sont assez surprenants et difficiles à interpréter dans l'état actuel de nos connaissances. Nous ignorons, notamment, dans quels organes de la drosophile se développent les particules infectieuses inoculées. Quoi qu'il en soit, cette

indépendance semble indiquer que le rendement des cellules n'est guère affecté par la taille qu'elles présentent, ni par les mitoses qu'elles subissent. Cette curieuse indépendance se retrouvera lors de l'étude de la transmission héréditaire du virus inoculé.

CHAPITRE II

Transmission héréditaire de la sensibilité acquise.

On sait depuis longtemps (L'Héritier et II. de Scoeux, 1947) que les femelles inoculées transmettent la sensibilité à une partie de leurs descendants. Les mâles injectés, par contre, ne la transmettent jamais. Ce transport d'un virus par les gamètes de l'hôte infecté est un phénomène relativement rare. Il s'observe cependant chez certains insectes vecteurs de viroses végétales (Fukushi, 1939 ; Black, 1953) et chez certaines plantes, particulièrement chez les légumineuses (voir Bawden, 1950).

Chez la drosophile, la rapide succession des générations et la détection aisée du virus permettent l'étude des modalités de cette transmission héréditaire.

TRANSMISSION DE LA SENSIBILITÉ PAR LES FEMELLES INOCULÉES.

Je me suis intéressée aux variations en fonction du temps de la fréquence des sensibles parmi les descendants de femelles inoculées. Les pontes de ces femelles ont été recueillies quotidiennement à partir du jour de l'inoculation ou bien de l'émergence imaginale, selon le stade où a été pratiquée l'injection. Les œufs ont été conservés à 20° jusqu'à l'éclosion des mouches qui furent alors soumises au test du gaz carbonique.

La figure 3 montre l'évolution de la fréquence des sensibles parmi les descendants de femelles inoculées à l'état imaginal avec 100 unités infectantes. Cette fréquence est portée en ordonnée ; en abscisse, est porté l'intervalle de temps qui sépare l'infection de la mère de la ponte des œufs. Sur cette même figure est représentée la courbe de multiplication globale du virus injecté aux mères (courbe 1 de la fig. 2). On voit que durant les onze premiers jours qui suivent l'inoculation, les femelles pondent des œufs qui ne fournissent que des individus résistants. Puis, au douzième jour, apparaissent quelques sensibles. Pendant les huit jours suivants, la fréquence de ces sensibles croît rapidement et atteint un maximum de 25 p. 100 environ. Ensuite, ce pourcentage diminue jusqu'au trentième jour et se fixe à une valeur voisine de 5 p. 100. Si l'on compare la courbe « en cloche » caractérisant cette évolution à la courbe de multiplication du virus dans la mouche, on voit que les sen-

sibles apparaissent dans la descendance vers la fin de la phase d'enrichissement en virus de la mère. Ensuite, ce rendement reste fixe jusqu'à la mort de la mouche, alors que les sensibles disparaissent peu à peu parmi ses enfants.

J'ai réalisé cinq expériences analogues au cours desquelles j'ai fait varier les facteurs suivants :

1° Le titre de l'inoculum initial ; de jeunes imagos femelles ont reçu en injection 1, 1 000 ou 13 000 unités infectantes.

2° Le moment de l'inoculation ; des drosophiles ont été

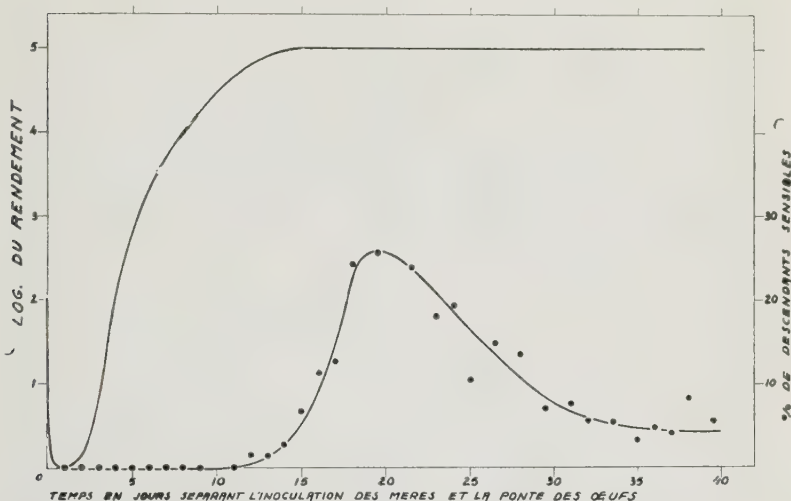


FIG. 3. — Evolution de la fréquence des sensibles parmi les descendants de ♀ inoculées à l'état imaginal avec 100 unités infectantes (cercles noirs, lecture des ordonnées à droite). La courbe de multiplication reproduite représente les variations du rendement moyen en virus chez les mères (lecture des ordonnées à gauche).

inoculées soit très jeunes, à l'état larvaire, soit quinze jours après l'émergence imaginale, alors qu'elles étaient déjà vieilles.

Les courbes « en cloche » obtenues sont analogues, mais sont décalées dans le temps comme le sont les courbes de multiplication qui leur correspondent. L'apparition des sensibles dans la descendance, comme l'apparition des particules virulentes dans la mouche, est d'autant plus précoce que l'inoculation des mères est plus riche et pratiquée plus tôt. Dans tous les cas, la ponte des premiers œufs infectés coïncide avec la fin de la phase de libération du virus chez les mères. Quant à la valeur maximum de la fréquence des sensibles parmi les descendants, elle varie de 20 à 40 p. 100 sans que cette variation ait pu être mise en

relation avec aucun des facteurs étudiés. Il en est de même de la durée de la période pendant laquelle les mouches transmettent activement le virus. Donc, la fréquence totale des descendants sensibles des mouches inoculées est indépendante du stade auquel est pratiquée l'inoculation et du nombre d'unités infectantes introduites. Ces deux mêmes facteurs déterminent, par contre, le moment où apparaissent les sensibles.

DISCUSSION DE CES RÉSULTATS.

Remarquons, tout d'abord, que les variations observées dans la fréquence des descendants sensibles au cours de la vie des femelles ne paraissent pas dépendre des variations du rythme de l'ovogenèse. On sait qu'au cours de la vie d'une drosophile ce rythme subit une évolution caractéristique. L'examen comparé des effectifs des descendants, au cours du vieillissement des femelles inoculées, montre que cette évolution est indépendante de la marche de la multiplication du virus. Or, dans les cinq expériences réalisées, chacune des trois phases caractéristiques de la transmission héréditaire se situe à des moments différents de l'évolution du rythme de l'ovogenèse. Il faut donc admettre que seuls les propriétés du virus et le déroulement de sa multiplication dans la mouche peuvent expliquer les modalités du transport de σ par les gamètes femelles.

L'existence de la phase de non-transmission qui s'observe après l'inoculation des mouches conduit à la conclusion suivante : le virus qui vient d'être inoculé ne peut pas pénétrer ou ne peut pas se multiplier dans les cellules du germe. En effet, si une cellule germinale s'infectait lors de l'injection, puisque la transformation d'une ovogonie en œuf ne dure que deux jours environ, l'œuf pondu quarante-huit heures plus tard contiendrait du virus. La lignée germinale semble donc s'infecter secondairement à partir des particules virulentes qui se sont multipliées dans le soma. La phase d'augmentation du nombre des sensibles parmi les descendants qui coïncide, nous l'avons vu, avec la phase d'enrichissement en virus chez la mère, correspondrait alors à l'envahissement du germe par les particules infectieuses émises par les cellules somatiques.

Au cours de la troisième phase, on assiste à la disparition progressive des sensibles dans la descendance des femelles qui restent pourtant, elles-mêmes, très riches en virus. Cette disparition semble paradoxale et est, en fait, difficile à expliquer. L'interprétation que l'on peut en donner diffère selon l'origine que l'on suppose à ces descendants résistants dont le nombre croît dans le temps.

On peut, en effet, tout d'abord penser que ces mouches résis-

tantes proviennent d'ovocytes qui n'ont jamais été infectés. Les descendants sensibles dérivent alors des ovocytes infectés. Dans une telle interprétation, l'invasion du germe est donc toujours partielle. Il faut supposer que le virus produit par les cellules somatiques ne peut pénétrer dans le germe que durant une période de la phase d'enrichissement de la mouche et perd ensuite, plus ou moins, cette capacité. Cette limitation peut difficilement s'interpréter comme un « vieillissement » du virus, car celui-ci reste par ailleurs infectieux jusqu'à la mort de la mouche. Mais on peut imaginer que les particules virulentes émises sont rapidement adsorbées à la surface de certaines cellules somatiques et deviennent, par là même, incapables d'envahir le germe. Ce mécanisme relativement simple n'explique, en fait, que la ségrégation en sensibles et résistants que l'on observe, à tout moment, parmi la descendance. La disparition même des sensibles ne peut s'expliquer qu'en compliquant l'hypothèse. On peut imaginer, par exemple, que la fréquence de pénétration efficace du virus est variable selon le stade des cellules germinales et présente sa valeur la plus faible chez les ovogonies. La persistance d'un certain nombre de sensibles parmi les derniers descendants proviendrait alors de l'infection peu probable de quelques cellules à l'état d'ovogonies. Mais l'indépendance observée entre la cinétique de transmission du virus et la cinétique de l'ovogenèse nous oblige à nouveau à compliquer l'hypothèse et à imaginer que les fréquences relatives de pénétration efficace peuvent dépendre également de l'âge de la mouche. Il faut reconnaître que, dans l'état actuel de nos connaissances, toutes ces constructions reposent sur des bases très fragiles.

Selon une seconde interprétation, les descendants résistants dérivent d'ovocytes qui, en fait, ont subi une infection, mais ont pu guérir avant d'être pondus. L'infection du germe, qui se situe comme précédemment pendant la phase d'enrichissement du soma, peut atteindre, cette fois-ci, la totalité des cellules. Les descendants sensibles proviennent alors d'ovules qui n'ont pas eu le temps de guérir avant la fécondation.

Quels mécanismes simples peut-on envisager pour cette guérison ?

a) Une première hypothèse consiste à supposer que le virus pénètre dans toutes les cellules germinales, mais ne se multiplie que pendant un stade déterminé de l'évolution des cellules, stade qui peut être, par exemple, celui du grand accroissement. La guérison provient de l'inactivation, au cours du temps, des particules en attente de multiplication. Comme l'a montré Sigot (1953), une inactivation spontanée du virus s'observe dans les spermatozoïdes. Il s'agit peut-être d'un mécanisme de même nature.

b) Selon une seconde hypothèse, le virus subit son cycle de multiplication dans les cellules germinales de tous les stades. Ce cycle aboutit à l'émission des particules virulentes vers l'extérieur de la membrane cellulaire et la guérison est la conséquence de cette libération. Cette hypothèse a été formulée par Brun pour expliquer les modalités de la transmission du virus par les

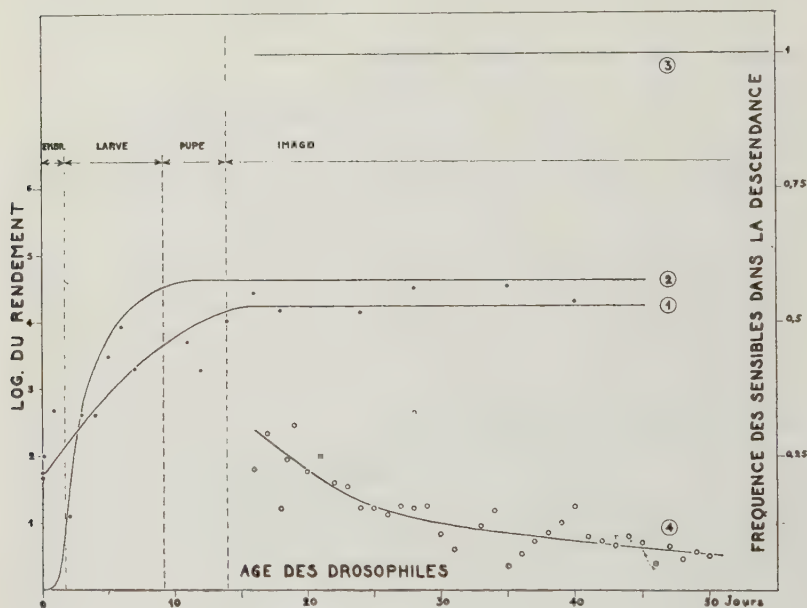


FIG. 4. — Multiplication du virus σ et passage à la descendance chez les drosophiles issues des deux croisements réciproques :
 1) ♀ sensible de souche pure x ♂ résistant (courbes 2 et 3).
 2) ♂ sensible de souche pure x ♀ résistante (courbes 2 et 4).
 Les ordonnées des courbes 1 et 2 sont à lire à gauche, celles des courbes 3 et 4 sont à lire à droite.

femelles de souche pure sensible soumises à un chauffage (communication personnelle).

Ces deux modes de guérison expliquent l'un et l'autre d'une manière satisfaisante la diminution des sensibles observée parmi les descendants. Nous ne possédons pas, à l'heure actuelle, de faits qui permettent d'opérer un choix entre eux.

Les deux interprétations de l'invasion du germen supposent, l'une et l'autre, que les cellules infectées fournissent une unique récolte de virus et se trouvent ensuite immunes. Imaginons, en effet, qu'il n'en soit pas ainsi et que l'émission de virus soit continue pendant la phase de stabilité du rendement de l'hôte.

Dans la première hypothèse, il se formerait à tout moment du virus apte à pénétrer dans le germen et l'envahissement de ce dernier serait progressif. Dans la seconde hypothèse, les cellules germinales ne se libéreraient jamais du virus.

TRANSMISSION DE LA SENSIBILITÉ
PAR LES FEMELLES TENANT LE VIRUS DE LEUR PÈRE.

De toutes façons, quel que soit le mécanisme intime de la multiplication du virus dans le germen, il semble bien que les mêmes lois régissent la transmission de σ par les mouches injectées et par les femelles tenant la sensibilité de leur père. L'évolution de la fréquence des sensibles parmi les descendants de telles femelles est représentée par la courbe 4 de la figure 4. Sur cette même figure, le graphique 2, qui est la reproduction de la courbe 3 de la figure 2, rappelle la cinétique de la multiplication du virus chez ces femelles. On voit que les premiers œufs qu'elles pondent fournissent environ 30 p. 100 de mouches sensibles. Puis, comme dans la descendance des drosophiles injectées, cette fréquence décroît et se fixe à une valeur minima. Cette diminution est sans doute l'équivalent de la partie descendante d'une courbe du type décrit plus haut. En effet, chez ces mouches, la multiplication du virus a lieu pendant la vie larvaire de l'hôte. Le germen s'infecte donc durant la période nymphale, alors qu'il ne comprend que des cellules immatures. Quand commence la ponte, les cellules germinales sont, ou bien déjà infectées, ou bien sur la voie de la guérison, selon la théorie acceptée. Ce que nous percevons expérimentalement n'est que la dernière phase de la transmission, c'est-à-dire la diminution de la fréquence des descendants sensibles. Il semble donc bien que ces drosophiles qui reçoivent σ par l'intermédiaire du spermatozoïde paternel se comportent comme des mouches inoculées, tant par la cinétique de la transmission héréditaire du virus que par la marche de sa multiplication dans l'hôte.

CHAPITRE III

Etude de la multiplication du virus dans les drosophiles des souches pures sensibles.

Les drosophiles des souches pures sensibles se distinguent nettement des drosophiles inoculées par la manière dont elles transmettent le virus. Les femelles de ces souches, en effet, n'engendrent que des descendants sensibles, génération après génération. Cette transmission indéfinie par voie maternelle est utilisée pratiquement pour la conservation des souches de virus.

Chez ces femelles, donc, le virus est un constituant cytoplasmique normalement hérité, mais il est « marqué » par le pouvoir infectieux qu'il possède à l'égard de drosophiles résistantes.

Les mâles de ces souches transmettent également le virus, mais à une partie seulement de leurs descendants. Nous avons vu que les descendants sensibles des mâles de souche pure croisés à des femelles résistantes se comportaient comme des drosophiles inoculées à l'état d'ovule, aussi bien par la cinétique de multiplication du virus que par son mode de transmission. La transmission régulière par hérédité maternelle, par contre, n'est pas du tout l'équivalent d'une infection précoce, comme va nous le montrer l'étude de la multiplication du virus chez les descendants des femelles de souche pure sensible. L'évolution du rendement en virus a été suivie au cours de la vie de ces mouches, selon la technique utilisée précédemment pour les drosophiles tenant la sensibilité de leur père. Les rendements sont figurés par des cercles noirs sur la courbe 1 de la figure 4. Le tableau II précise les résultats obtenus avec les œufs qui viennent d'être pondus.

TABLEAU II. — Rendement moyen en virus
des œufs de drosophiles de souche pure au moment de la ponte.

NOMBRE D'ŒUFS	TEMPS ÉCOULÉ depuis la ponte	LOGARITHME du rendement moyen
16	Moins de 3 heures	1,68
36	Moins de 2 heures	1,75

On voit que les œufs, à la ponte, sont relativement riches et contiennent environ 50 particules infectieuses. Ensuite, durant la vie embryonnaire et la vie larvaire, le rendement individuel en virus croît plus lentement que chez les mouches inoculées, et atteint durant la pupaison une valeur limite qui paraît rester stable jusqu'à la mort de la drosophile. Le logarithme de cette valeur limite, calculé en prenant la moyenne des logarithmes des rendements correspondant aux points d'abscisse supérieure à treize jours, est $4,24 \pm 0,10$. Ce niveau n'est pas significativement différent de celui trouvé pour les drosophiles inoculées avec une seule unité infectante ; celles-ci sont, rappelons-le, les mouches inoculées les plus pauvres en virus.

Il est particulièrement intéressant de comparer la cinétique de cette multiplication à celle qui caractérise les mouches tenant la sensibilité de leur père. En effet, dans les deux cas, l'infection est précoce et la multiplication a lieu pendant la période de croissance active de l'hôte. Les courbes correspondantes sont les graphiques 1 et 2 de la figure 4 ; les ordonnées sont à lire sur l'échelle de gauche. Les différences constatées sont les suivantes :

1° Les œufs pondus par les femelles résistantes croisées à des mâles de souche pure sensible ne contiennent pas de virus infectieux. Sans doute, les quelques rares particules virulentes reçues sont-elles sous forme de virus végétatif, en voie de multiplication.

Les œufs pondus par les femelles des souches héréditaires sensibles, par contre, contiennent une cinquantaine d'unités infectantes.

2° Lorsque la sensibilité vient du père, le rendement en virus de l'embryon et de la jeune larve croît rapidement. Le niveau final est atteint à la fin de la vie larvaire. Dans l'autre cas, ce même rendement augmente lentement et n'atteint sa valeur maxima qu'au début de la vie imaginale.

3° La valeur du rendement final est plus élevée pour les drosophiles sensibles de père que pour les drosophiles de souche pure. La moyenne des déterminations faites plus de treize jours après la ponte est égale, en effet, à 4,60 dans le premier cas et 4,24 dans le second. La différence est significative, le *t* de Student présentant une valeur de 2,5 pour 17 degrés de liberté, soit une probabilité de 0,02.

Si nous comparons maintenant les modalités de la transmission héréditaire chez ces deux sortes de drosophiles, nous constatons qu'elles sont également fort différentes. Les mouches de souche pure transmettent la sensibilité à tous leurs enfants, les femelles sensibles par leur père à une fraction seulement, la fréquence des descendants sensibles décroissant au cours de la période de ponte. C'est ce que montrent les courbes 3 et 4 de la figure 4 (lecture des ordonnées à droite).

La multiplication du virus et sa transmission se font donc selon des modalités très différentes chez ces deux catégories de mouches. Pourtant, elles possèdent, par ailleurs, de nombreuses propriétés communes :

1° Elles ont le même génotype chromosomique ; elles proviennent, en effet, des deux croisements réciproques :

♀ de souche pure Oregon sensible × ♂ résistant Oregon ;

♀ résistante Oregon × ♂ de souche pure Oregon sensible.

2° Le virus que l'on en extrait présente les mêmes propriétés quand on l'inocule à des drosophiles résistantes.

3° Dans l'un et l'autre cas, la multiplication du virus a lieu pendant la vie embryonnaire et larvaire de l'hôte.

Aucun de ces trois facteurs ne peut donc être responsable des différences que nous observons dans la multiplication du virus et dans sa transmission.

Par ailleurs, la lenteur de la multiplication du virus chez les descendants de femelles de souche pure sensible n'est pas due à des phénomènes d'immunité classique, en relation avec la formation d'anticorps qui puissent persister après le départ du virus.

En effet, parmi les drosophiles d'une souche pure sensible, on trouve parfois un faible pourcentage de mouches non sensibles. Il se trouve que ces mouches se comportent^t comme des résistantes banales ; elles ne contiennent pas de virus et elles deviennent sensibles dans les délais normaux quand elles reçoivent^t une injection virulente. Il semble donc que cette sorte d'immunité que présentent les mouches des souches pures ne puisse être séparée du virus qu'elles hébergent. Notons en outre que cette « immunité » ne les empêche pas de transmettre le virus à tous leurs descendants.

DISCUSSION.

Les recherches sur la multiplication des particules σ apportent des faits précis qui éclairent la vieille discussion de la nature exacte de ces particules.

Lorsqu'elles sont introduites par inoculation ou par le spermatozoïde, les particules σ se comportent classiquement comme un virus. L'absence de symptômes pathologiques et la transmission du virus à une fraction de la descendance ne sont pas exceptionnelles pour une virose. Rappelons que ces deux caractères se retrouvent chez certains insectes vecteurs de viroses végétales sans que personne ait jamais contesté à l'agent infectieux le nom de virus. Les seules caractéristiques vraiment originales du virus σ sont :

a) L'indépendance de la cinétique de sa multiplication par rapport aux stades de développement de l'hôte ;

b) Les modalités curieuses de sa transmission par les femelles inoculées. Il se pourrait cependant que ces faits aient une portée plus générale et puissent être retrouvés pour d'autres virus.

Lorsque la sensibilité est apportée par hérédité maternelle régulière, il semble qu'un équilibre spécial s'établisse entre les particules σ et le cytoplasme de l'hôte. En effet, les femelles des souches pures sensibles transmettent la sensibilité à tous leurs descendants alors qu'elles sont pauvres en virus et que, chez elles, la multiplication de celui-ci semble freinée. Ces mouches, pourtant, nous l'avons vu, sont de même génotype que les autres, contiennent le même virus infectieux et retrouvent les propriétés des mouches résistantes banales dès qu'elles ont accidentellement perdu le virus. Cette transmission régulière de σ par hérédité maternelle l'a fait, pendant long'emps, considérer comme une particule cytoplasmique. Nous constatons effectivement maintenant que cette transmission n'est pas du tout l'équivalent d'une infection précoce du germen par le virus présent dans le soma. Elle paraît impliquer une véritable intégration du virus au cytoplasme de la drosophile.

Il semble donc que suivant les cas les particules σ puissent se

comporter de deux manières différentes. Cette dualité que nous entrevoyons ici sera confirmée et précisée par l'étude de l'apparition, chez les descendants de femelles inoculées, des caractères propres aux mouches tenant la sensibilité par hérédité maternelle régulière. Cette étude, due à Brun et Sigot, fait l'objet du second mémoire de cette série.

RÉSUMÉ.

Le virus σ peut être introduit dans une drosophile soit par inoculation artificielle, soit par hérédité maternelle ou paternelle.

1° Chez les drosophiles inoculées et chez les drosophiles tenant la sensibilité de leur père, la marche de la multiplication de σ est typiquement celle d'un virus. La cinétique de cette multiplication est indépendante de l'âge de la drosophile infectée, mais dépend, par contre, de la richesse de l'inoculum initial.

La sensibilité ainsi acquise est transmise à une partie de la descendance des femelles pendant une partie de leur période de ponte. Les modalités précises de cette transmission sont étudiées.

2° Chez les drosophiles tenant la sensibilité par hérédité maternelle régulière, la multiplication du virus est lente et le niveau final atteint est plus faible que dans le cas des drosophiles inoculées.

La sensibilité ainsi héritée est transmise à la totalité des descendants des femelles.

Le comportement du virus est donc très différent chez les deux catégories de drosophiles étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

- M. A. BAWDEN. *Plant viruses and Virus diseases*. Chronica botanica Co., Waltham, Mass, 1950.
- L. M. BLACK. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1953, **56**, 398.
- G. BRUN et A. SIGOT. *Ces Annales* (sous presse).
- H. J. F. CAIRNS. *J. Immunol.*, 1952, **69**, 168.
- R. DULBECCO et M. VOGT. *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 183.
- E. L. ELLIS et M. DELBRÜCK. *J. gen. Physiol.*, 1939, **22**, 365.
- T. FUKUSHI. *Proc. imp. Acad.*, 1939, **15**, 142.
- W. HENLE, G. HENLE et G. B. ROSENBERG. *J. exp. Med.*, 1947, **86**, 423.
- W. HENLE, O. C. LIU et N. B. FINTER. *J. exp. Med.*, 1954, **100**, 53.
- F. L. HORSFALL. *J. exp. Med.*, 1954, **100**, 135.
- PH. L'HÉRITIER. *Heredity*, 1948, **2**, 325.
- PH. L'HÉRITIER. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.*, 1951, **16**, 99.
- PH. L'HÉRITIER et F. HUGON DE SCOËUX. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1947, **81**, 70.
- N. PLUS. *Exp. Cell Res.*, 1950, **1**, 217.
- N. PLUS. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1954, **88**, 248.
- W. F. SCHERER et J. T. SYVERTON. *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 369.
- A. SIGOT. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 1953, **87**, 335.

ÉTUDE DE LA BIOCHIMIE DE LA SPORULATION CHEZ *BACILLUS MEGATERIUM*

II. — MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES ET ÉCHANGES GAZEUX ACCOMPAGNANT LA SPORULATION PROVOQUÉE PAR CARENCE DE GLUCOSE

par RÉGINA TINELLI (*).

(Institut Pasteur. Service des Fermentations
[professeur LEMOIGNE].)

Dans un précédent Mémoire [10] nous avons vu que, au cours de la sporulation de *Bacillus megaterium*, les réserves contenues dans les bacilles disparaissent. Cette disparition est totale pour le lipide β -hydroxybutyrique et partielle pour le polyoside.

L'étude du devenir de ces substances disparues fait l'objet du présent Mémoire.

Plusieurs hypothèses peuvent être faites sur leurs transformations :

1° Elles passent sans modifications dans le milieu (qui ne contient aucune substance carbonée) ;

2° Elles sont hydrolysées et apparaissent dans le milieu sous forme d'acides organiques et de sucres réducteurs ;

3° Elles sont totalement métabolisées : une analyse de gaz permettra alors de vérifier cette hypothèse.

1° RECHERCHE DU POLYOSIDE ET DU LIPIDE β -HYDROXYBUTYRIQUE DANS LE MILIEU. — A l'examen microscopique, nous n'avons pas vu de granules lipidiques dans le milieu (alors que dans le cas de sporulation incomplète, des granules sont libérés).

Le milieu dans lequel s'est effectuée la sporulation est, après centrifugation des spores, concentré sous vide à basse température. Jamais nous n'avons pu mettre en évidence la présence de polyoside ou de lipide (tableau I).

2° RECHERCHE DE PRODUITS D'HYDROLYSE. — a) Recherche de sucres réducteurs : elle fut toujours négative (voir tableau I).

b) Recherche des acides organiques.

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 novembre 1954.

a) Au moment où les bacilles présentent des spores incluses : 3 300 mg de bacilles sont remis en suspension dans 2 l de milieu minéral sans glucose et aérés par insufflation d'air. En suivant au microscope l'évolution de la morphologie des bacilles, nous avons arrêté l'expérience au moment où tous les bacilles présentent des spores incluses.

La matière sèche restante est 2,160 g ; il y a donc une perte de matière sèche de 1,140 g (34,4 p. 100).

La courbe de Duclaux montre qu'à ce stade il n'y a que de l'acide acétique formé. Sa concentration est de 24 mg, soit 2 p. 100 de la M. S. disparue.

La recherche des acides fixes a été faite après extraction à l'éther : dans le résidu brut obtenu après évaporation de l'éther, nous n'avons pu caractériser l'acide β -hydroxybutyrique.

TABLEAU I.

Temps en heures	M.S. mg	mg Lipide β -hydroxybutyrique		mg Polyside		Divers réducteurs
		dans les bacilles	dans le milieu	dans les bacilles	dans le milieu	
0	100	31	0	18	0	0
3	76,4	21,5	0	12,2	0	0
5	73	19	0	11	0	0
7 spores incluses	66,6	16,9	-	-	0	0
11	46,6	5,6	0	4,3	0,3	0
20	38	0,3	0	1,8	0,4	0

β) Après la libération des spores : 2,250 g de bacilles sont mis à sporuler : le poids de spores recueillies est de 0,810 g, ce qui fait une perte de matière sèche microbienne de 1,440 g (soit 64 p. 100). L'acidité volatile correspond à 8,3 ml de soude N/25 et la courbe obtenue indique qu'il s'agit d'un mélange d'acides. Exprimée en acide acétique, la quantité d'acides volatils serait 20 mg, soit 1,5 p. 100 de la matière microbienne disparue. Etant donnée la faible concentration de ces acides, nous n'avons pas cherché à les identifier.

En ce qui concerne les acides fixes, nous avons obtenu, après extraction à l'éther, un résidu dans lequel nous n'avons pu mettre nettement en évidence la présence d'acide β -hydroxybutyrique.

c) Recherches de l'acétoïne, de l'alcool : elles ont toujours donné des résultats négatifs.

d) Recherche de substances azotées : de faibles quantités

d'azote organique et ammoniacal ont été retrouvées : les valeurs seront données plus loin.

CONCLUSION. — Lorsque la sporulation est totale, on ne retrouve dans le milieu de culture que de très faibles quantités de substances provenant de la dégradation du lipide ou du polyoside, et des matières azotées (toujours moins de 10 p. 100 de la matière sèche disparue).

Il reste alors à envisager la dernière hypothèse : les substances disparues au cours de la sporulation sont presque totalement métabolisées jusqu'au stade CO_2 et H_2O . La mesure des échanges gazeux est alors nécessaire pour établir un bilan.

3° ANALYSE DE GAZ EN FIN DE SPORULATION. — L'analyse et le dosage des gaz produits ou disparus au cours de la sporulation imposent une modification des conditions expérimentales de production des spores : il faut travailler en atmosphère confinée, mais s'assurer que l'aération est suffisante pour que la sporulation soit toujours complète, et qu'ainsi il n'y ait pas production de métabolites secondaires.

Après de nombreux essais, nous avons pu reproduire les mêmes conditions de sporulation totale en opérant de la façon suivante : 100 mg environ de bacilles (en poids sec) sont remis en suspension dans 50 ml de milieu minéral sans glucose dans un ballon de 3 l, à fond plat (l'aération est meilleure). Une tubulure latérale contient 1 ml d'acide orthophosphorique. L'étanchéité est assurée par une gaine de paraffine. Le ballon est placé sur l'agitateur, à l'étuve à $29^\circ\text{--}30^\circ$; le faible volume du liquide permet une bonne aération malgré l'atmosphère confinée. Le volume de CO_2 formé pouvant être supérieur à celui de l'oxygène disparu, il convient de faire une légère dépression (2 à 3 cm de Hg) au départ.

Dans ces conditions, un ballon témoin montre que vingt heures en moyenne après la remise en suspension des bacilles, il n'y a que des spores libres. Le ballon est alors enlevé de l'agitateur et placé dans un récipient contenant de la glace fondante ; les gaz sont extraits à l'aide d'une pompe à mercure. Peu avant la fin de l'extraction, on fait couler l'acide phosphorique afin de libérer le CO_2 fixé par le milieu.

Le volume gazeux est mesuré dans un volumètre. Sur une partie aliquote, on dose le CO_2 par différence en le faisant absorber par de la potasse dans une pipette de Doyère. De la même façon, on dose l'oxygène en le faisant absorber par du pyrogallate de potassium. Les volumes gazeux sont mesurés dans un eudiomètre de Schloesing. Le gaz résiduel est de l'azote

dont on admet que le volume n'a pas varié au cours de l'expérience. Ce volume multiplié par $\frac{20,6}{79}$ représente donc le volume initial d'oxygène.

Comme les volumes sont calculés par différence entre deux lectures volumétriques, et que les mélanges finals ont habituellement une teneur en O_2 de l'ordre de 17 p. 100 et une teneur en CO_2 de l'ordre de 3 p. 100, l'erreur sur les résultats peut être estimée à 3 p. 100 pour l' O_2 et à 5 p. 100 pour le CO_2 . Notons que la quantité d' O_2 résiduel montre que, malgré l'atmosphère confinée, ce gaz était en large excès.

Après extraction des gaz, on centrifuge : sur le culot, on détermine la M. S. et l'azote total ; sur le liquide, on dose l'azote nitrique, ammoniacal et organique, des expériences analogues ayant montré qu'il n'y a formation que de traces négligeables d'acides organiques.

Nous rapporterons les résultats de deux de nos expériences (ceux de la première étant donnés en détails) :

EXPÉRIENCE n° 1 :

Poids de bacilles au départ	123 mg
Poids de spores récoltées	42 mg
Perte de M.S. totale	83 mg
Perte de M.S. organique	76 mg (70 %)

La composition de la M. S. est exprimée dans les tableaux II et III.

Un bilan d'azote permet de vérifier ces différents dosages. Azote initial :

Bacilles	8	mg N organique
milieu	{	70,2 mg N nitrique
		0,37 mg N ammoniacal
		<hr/>
		78,57 mg d'azote au début de l'expérience

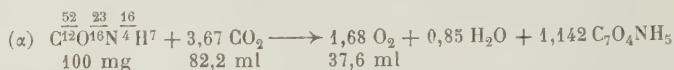
Azote final :

	{	5,5 mg N protéique
Spores	{	68,7 mg N nitrique
		2,26 mg N ammoniacal
		0,98 mg N organique
		<hr/>
		77,44 mg d'azote en fin d'expérience

ce qui fait une erreur de 1,4 p. 100.

L'azote retrouvé dans l'acide dipicolinique correspond à l'azote de 2,25 mg de protéines. Nous écrirons arbitrairement l'équation de cette transformation selon la réaction :

Protéine transformée en acide dipicolinique ($C_7O_4NH_5$) :



La quantité de protéines effectivement disparue est :

$$50 \text{ mg} - (32,1 - 6,13 - 2,25) = 9,52 \text{ mg}$$

protéine protéine protéine ac. dipicol.
bacilles spores milieu en protéine

TABLEAU II.

Constituants (on ne tient pas compte des cendres)	Microbes (125 mg)	Spores (42 mg)	Différences en mg
Lipide β -hydroxybutyrique	37,5	0	- 37,5
Polyosido	22,5	1,9	- 20,6
Dipicolinate de calcium (exprimé en acide dipi- colinique)	0	4,37	+ 4,37 (+ 2,25 en protéines)
N (Kjeldahl)	8,0	5,5 $\left\{ \begin{array}{l} 0,36 \text{ ac.} \\ \text{dipicol.} \\ 5,14 \text{ prot.} \end{array} \right.$	- 2,5
Protéines	50	32,1	- 17,9

TABLEAU III.

	Début d'expérience en mg	Fin d'expérience en mg	Différence en mg
Lipide β -hydroxybutyrique	0	0	-
Acides volatils	0	traces	-
Acides fixes (β -hydroxybutyrique)	0	0	-
Polyoside	0	0	-
Sucres réducteurs	0	0	-
N (Kjeldahl)	0	0,98	+ 0,98
Protéines	0	6,13	+ 6,13
N ammoniacal	0,37	2,26	+ 1,89
N nitrique	70,2	68,7	- 1,5
NO ₃ K	507	496	- 11
NO ₂ K	0	0	-

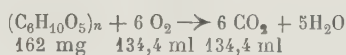
Finalement, les quantités de substances disparues au cours de la sporulation sont :

Polyoside	20,6 mg
Lipide β	37,5 mg
Protéines.	9,52 mg

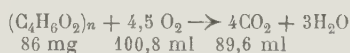
substances que nous supposons avoir été totalement métabolisées.

I. CALCUL DES VOLUMES THÉORIQUES DE CO_2 ET D' O_2 . — Si l'on admet les réactions d'oxydation suivantes (en adoptant la moyenne de 16 p. 100 d'N dans la composition des protéines),

1° *Polyoside* :



2° *Lipide β -hydroxybutyrique* :



3° *Protéines* :



on doit trouver que les quantités de polyosides, lipide, protéines disparues au cours de la sporulation ont provoqué la disparition ou la formation des volumes suivants d'oxygène et de gaz carbonique :

	ml O_2 CONSOMMÉ	ml CO_2 DÉGAGÉ
20,7 mg de polyoside	17,2	17,2
37,5 mg de lipide β	43,95	39,2
9,52 mg de protéines	9,58	9,22
	<hr/> 70,73	<hr/> 65,62

D'après l'équation (α), il convient de soustraire de ces valeurs : 0,84 ml d' O_2 et 1,85 ml de CO_2 .

Finalement, les résultats théoriques sont :

O_2 consommé	69,89 ml
CO_2 dégagé	63,77 ml

II. RÉSULTATS DE L'ANALYSE DE GAZ DANS L'EXPÉRIENCE I :

O_2 air consommé	66,8 ml
CO_2 apparu	67,4 ml

Mais le tableau III montre qu'il y a eu disparition de 11 mg de nitrate de K ayant libéré de l'oxygène utilisable par les bacilles. Avec Lemoigne et coll., nous avons montré, en effet, que *B. megaterium* au cours de sa croissance est capable de couvrir le tiers de ses besoins d'oxygène par l'oxygène nitrique [5]. Ici, au cours de la sporulation, l'oxygène nitrique utilisé n'est que 3,6 ml. Ainsi, le volume total d'oxygène consommé au cours de la sporulation est 70,4 ml.

TABLEAU IV. — Résumé des résultats obtenus dans l'expérience I.
(Matière sèche organique disparue : 76 mg.)

	Résultats expérimentaux		Résultats théoriques	
O ₂ consommé	70,4 ml	100,5 mg	69,9 ml	99,5 mg
CO ₂ dégagé	66,2 ml	131,7 mg	63,8 ml	125 mg
CO ₂ /O ₂	0,94		0,91	
O ₂ total	132		130,7	
MS disparue				
CO ₂				
MS disparue	173		164	

TABLEAU V. — Résumé des résultats obtenus dans l'expérience II.
(Matière sèche disparue : 62 mg.)

	Résultats expérimentaux		Résultats théoriques	
O ₂ consommé	60,4 ml	86,28 mg	58,84 ml	84 mg
CO ₂ dégagé	57,6 ml	112,89 mg	54,2 ml	106,23 mg
CO ₂ /O ₂	0,95		0,92	
O ₂	139		133	
MS disparue				
CO ₂	182		171,3	
MS disparue				

CONCLUSION.

Aux erreurs d'expérience près et malgré l'arbitraire des équations chimiques appliquées, on peut affirmer que, au cours d'une sporulation, toute la matière sèche initiale des bacilles se retrouve sous forme de matière sèche des spores, de CO₂ et de H₂O.

Ces résultats ne sont valables que dans le cas de sporulation totale. Lorsque celle-ci est partielle, à cause d'une mauvaise aération, il y a passage dans le milieu, d'acide et de lipide

β -hydroxybutyrique et d'acide acétique, ces produits provenant de la lyse des bacilles.

Selon Powell et Hunter, 1953 [8], la sporulation s'accomplirait aux dépens de la lyse de 80 à 90 p. 100 des cellules remises en suspension dans de l'eau distillée.

Plus récemment, Perry et Foster, 1954 [7], travaillant sur *B. mycoides*, concluent que chaque spore est formée à partir d'une cellule végétative, ce qui implique donc que la sporulation ne se fait pas aux dépens de la lyse d'un certain nombre de cellules.

Dans le cas de *B. megaterium*, l'examen microscopique a montré que toutes les cellules sporulent; le métabolisme qui aboutit à la formation de la spore se produit dans chaque cellule.

ETUDE CINÉTIQUE DES ÉCHANGES GAZEUX (1).

Nous avons employé la méthode de Warburg de deux façons différentes :

PREMIÈRE TECHNIQUE. — Les bacilles sont remis en suspension dans le milieu sans glucose contenu dans des fioles de 3 l. On fait 3 prélèvements : le premier immédiatement après la remise en suspension, le second au moment de l'apparition des spores incluses, le troisième, au stade des spores libres. On lave trois fois avec du milieu minéral et, après centrifugations à la chambre froide, on fait une suspension de bacilles ou de spores. Chaque cupule contient :

0,5 ml de la suspension de bacilles ou de spores ;

1,4 ml de milieu avec ou sans glucose ;

0,1 ml de potasse ou d'eau dans la tubulure centrale.

Chaque expérience, faite à 29° dans l'air, dure environ une heure trente. Les lectures sont faites toutes les quinze minutes ; on calcule le QO_2 moyen dans chaque cas.

Résultats : Ils montrent que la consommation d'oxygène diminue au cours de la sporulation : le QO_2 , qui est de 32 chez les bacilles, n'est plus que de 3,5 chez les jeunes spores libres. Ces spores paraissent donc avoir une respiration endogène.

L'existence d'une telle respiration a été mentionnée par Cook, 1932 [4], chez les spores de *B. subtilis* ; en recalculant les données de ses courbes, on trouve pour le QO_2 un chiffre voisin de 1. Keilin et Hartree, 1947 [4], trouvent pour les spores de ce même bacille, un QO_2 (37°) variant de 0,3 à 4 alors que celui des formes végétatives est 90. Crook, 1952 [2], obtient pour les spores de *B. subtilis* et de *B. anthracis* non traitées par la chaleur un QO_2

(1) Nous remercions M. Grelet, Chargé de Recherches au C. N. R. S., pour les conseils qu'il nous a donnés au cours de cette étude.

égal à 0,3. Par contre, selon Hardwick et Foster, 1954 [3], la consommation d'oxygène cesse quand la sporulation est complète et que les sporanges ne persistent pas. Or, chez *B. megaterium*, les sporanges ne persistent pas et il y a néanmoins continuation des échanges gazeux.

Nous avons alors mesuré la consommation d'oxygène directement sur des spores recueillies douze heures après leur apparition dans les bâtonnets. 0,5 ml de la suspension de spores recueillies (8 mg) est remis dans chaque cupule contenant 1,4 ml de milieu minéral :

- Avec glucose, sans nitrate (I) ;
- Avec glucose, avec nitrate (II) ;
- Sans glucose, sans nitrate (III) ;
- Sans glucose, avec nitrate (IV).

Les lectures sont faites pendant quatre heures à 29°. Au bout de ce temps les spores n'ont pas germé (à l'examen microscopique, les suspensions ne contenaient que des spores).

Résultats. — Dans tous les cas il y a consommation d'oxygène.

Le QO_2 (30°) moyen est :

4	dans le milieu	I
2,7	dans le milieu	II
1,5	dans le milieu	III
1,4	dans le milieu	IV

De plus, la consommation d'oxygène est plus élevée lorsque le milieu ne contient pas de nitrate, ce qui laisse supposer que le système réducteur de nitrate fonctionne déjà, et que la spore, tout comme le bacille, est capable d'utiliser l'oxygène du nitrate aussi bien que l'oxygène de l'air [5, 6]. Il ne faut cependant pas perdre de vue que ces spores, étant sur milieu complet, sont en instance de germination, et, qu'ainsi, les phénomènes qui se produisent peuvent être différents de ceux qui se déroulent sur glucose seul.

Cette première technique donne un résultat global : le QO_2 qui est de 32 chez les bacilles diminue au cours de la sporulation pour atteindre 1,5 dans les spores. Mais il serait intéressant de connaître quelles variations peut subir la consommation d'oxygène entre les différents moments où sont faits les prélèvements.

Cette étude nous a amenée à la technique suivante :

DEUXIÈME TECHNIQUE. — La mesure des échanges gazeux est faite pendant tout le cours de la sporulation.

Les bacilles, lavés trois fois, sont remis à sporuler directement dans les cupules de Warburg. Chaque cupule contient : 1,4 ml de milieu minéral additionné ou non de glucose, 0,5 ml de suspension de bacilles, et dans la tubulure centrale 0,1 ml de potasse

ou d'eau. Ces manipulations préliminaires sont faites à la chambre froide (4°).

L'expérience est faite à 29° dans l'air. Des prélèvements dans des cupules témoins permettent de suivre, au microscope, la marche de la sporulation. Les spores incluses apparaissent dans les mêmes délais que dans les expériences réalisées en fioles ou en ballons. Les mesures sont faites toutes les dix, puis trente minutes, jusqu'au moment où tous les bacilles présentent des spores incluses, c'est-à-dire en moyenne neuf à dix heures après la remise en suspension. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir suivre, avec plus de précision, les variations des échanges gazeux pendant tout le temps que dure la sporulation, mais le poids de matière sèche diminuant au cours de ce phénomène, il est impossible ici de calculer le QO_2 ; les résultats sont donc exprimés en μl d' O_2 pour 0,5 ml de suspension de bacilles correspondant à :

7 mg de bacilles au départ, expérience 1

Résultats. — Toutes les expériences que nous avons faites nous ont donné des résultats analogues à ceux que nous rappelons ici et dont les résultats sont résumés par les courbes représentées, figures 1 et 2.

L'allure de ces courbes est différente de celle obtenue par Hardwick et Foster [3] dans le cas de *B. mycoides* : ici, les courbes traduisant les variations de la consommation d'oxygène présentent un point d'inflexion (fig. 1), ce qui indique une augmentation suivie d'une diminution de la consommation d' O_2 . Le phénomène est mis davantage en évidence par la courbe I' (fig. 2) représentant la dérivée de la précédente, c'est-à-dire la vitesse de la consommation d'oxygène par minute. Cette augmentation se produit deux heures à deux heures trente après la remise en suspension des bacilles et cesse avant l'apparition des spores incluses.

Discussion. — Une telle augmentation des échanges gazeux est assez remarquable. On s'attendrait, en effet, à une diminution progressive de la respiration jusqu'au niveau de la respiration endogène des spores. Cette diminution serait due à deux causes :

- 1° La perte de matière sèche qui est progressive,
- 2° Le fait que la respiration endogène des spores est, à poids égal, inférieure à celle des bacilles.

On est donc conduit à supposer que le mécanisme de la sporogénèse comporte une oxydation très intense pour la synthèse et le remaniement de certains constituants cellulaires. Ce sont ces réactions qui, déclenchées peu de temps après la remise en

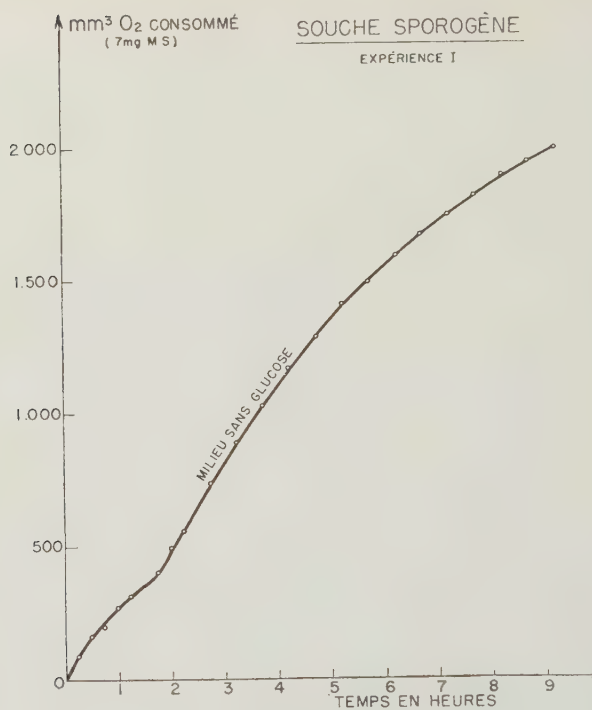


FIG. 1.

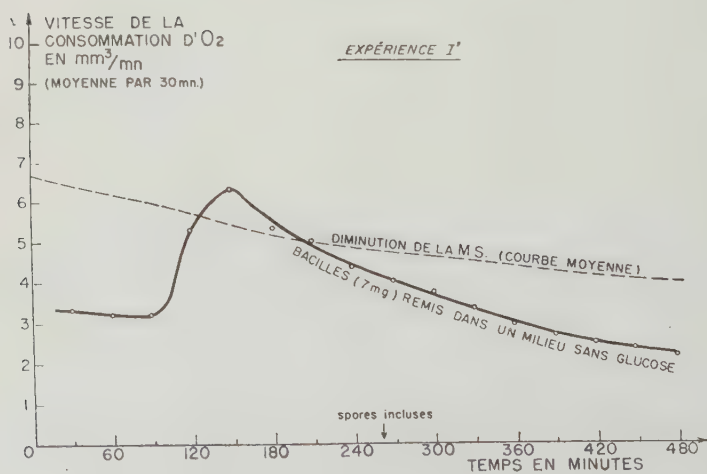


FIG. 2.

suspension des bacilles dans le milieu sans glucose, et terminées avant toute sporulation visible, permettent l'élaboration du matériel de la spore.

D'après les résultats exposés précédemment [10] ces réactions coïncident avec la formation des nouveaux constituants de la spore : acide uronique, dipicolinate de calcium, et probablement aussi, avec un nouvel arrangement des protéines.

Afin de faire une brève vérification de l'hypothèse « liaison entre la sporulation et augmentation des échanges gazeux », nous avons étudié le comportement d'une souche de *B. megaterium* asporogène, mise dans les conditions de sporulation totale précédemment décrites. Cette étude fera l'objet du prochain mémoire.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Lorsque la sporulation est partielle (à cause d'une aération insuffisante), on retrouve dans le milieu des granules de lipide β -hydroxybutyrique, des acides acétique et β -hydroxybutyrique et des protéines provenant de l'autolyse des bacilles.

Lorsque la sporulation est totale, on ne retrouve dans le milieu que très peu de protéines et des traces négligeables d'acides organiques.

L'analyse des gaz en fin de sporulation montre que la presque totalité des réserves du bacille, disparues au cours de ce phénomène, sont métabolisées en CO_2 et H_2O .

La mesure des échanges gazeux au cours de la sporulation permet de mettre en évidence une augmentation de la consommation d' O_2 avant l'apparition des spores incluses. C'est dans cette phase que le mécanisme de la sporogénèse est déclenché irréversiblement.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. P. COOK. *Biol. Rev.*, 1942, **7**, 1.
- [2] P. G. CROOK. *J. Bact.*, 1952, **63**, 193.
- [3] W. A. HARDWICK et J. W. FOSTER. *J. gen. Physiol.*, 1952, **35**, 907.
- [4] D. KEILIN et E. F. HARTREE. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1947, **42**, 115.
- [5] M. LEMOIGNE, J.-P. AUBERT, P. BRECHOT et R. TINELLI. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **232**, 1799.
- [6] M. LEMOIGNE, R. TINELLI et P. BRECHOT. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **232**, 899.
- [7] J. J. PERRY et J. W. FOSTER. *J. gen. Physiol.*, 1954, **37**, 401.
- [8] J. F. POWELL et J. R. HUNTER. *J. gen. Physiol.*, 1953, **36**, 601.
- [9] R. TINELLI. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 836.
- [10] R. TINELLI. *Ces Annales*, 1955, **88**, 212.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)

Séance du 6 Janvier 1955.

Présidence de M. PRÉVOT

PRÉSENTATION D'OUVRAGES

M. Lépine. — J'ai l'honneur de présenter à la Société de Microbiologie l'ouvrage de F. Jacob sur les bactéries lysogènes et la notion de provirus (1). On sait le développement, imprévu il y a une trentaine d'années, qu'ont pris les études de la bactériophagie et l'importance que les recherches sur le bactériophage revêtent aujourd'hui dans le domaine théorique de la génétique bactérienne comme de la genèse des virus.

Les recherches sur les bactériophages, parties à l'origine de considérations pratiques visant à des applications au diagnostic ou à la thérapeutique des maladies infectieuses, ont abouti à faire du bactériophage un merveilleux moyen d'étude de la structure intime des bactéries et de leur stock héréditaire. On sait aussi que la notion de prophage, due à Lwoff et Gutmann, s'applique à une phase du cycle de bactériophages propres aux bactéries lysogènes et capables d'apparaître soit par mutation, soit par induction sous l'influence de facteurs externes.

Ces notions nouvelles ont été à plusieurs reprises traitées en différents mémoires, mais il n'existait pas jusqu'ici d'étude d'ensemble de la lysogénie ; aussi l'étude de F. Jacob vient-elle à son heure et se recommande-t-elle par la clarté de son exposition et la richesse de sa documentation.

Après un chapitre d'introduction qui retrace l'histoire du bactériophage et de la lysogénie, l'auteur commence par définir la terminologie et les méthodes expérimentales appliquées à l'étude du phénomène. Ce souci de préciser la terminologie est loin d'être inutile quand on se souvient que les théoriciens de l'étude du bactériophage ont créé un certain nombre de termes d'acception nouvelle ou restrictive et qui peuvent au premier abord surprendre lorsqu'on voit le mot de « bactériophage virulent » répondre à la définition de « bactériophage incapable de donner des systèmes lysogènes ». L'auteur étudie ensuite la produc-

(1) F. Jacob, *Les bactéries lysogènes et la notion de provirus*, 1 vol., 176 pages, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1954.

tion spontanée et la production induite des bactériophages sous l'influence des facteurs externes tels que les rayons ultraviolets, les rayons X ou gamma, l'ypérite azotée, tous agents que nous connaissons de longue date comme des agents mutagènes, ce qui permet déjà d'entrevoir les analogies existant entre la lysogénie et les caractères acquis par mutation dans les systèmes cellulaires classiques.

Dans les chapitres suivants, l'auteur étudie l'immunité et sa disparition après l'induction, le sort des particules infectantes après pénétration dans les bactéries immunes, les mutants virulents inducteurs de bactériophages tempérés (c'est-à-dire producteurs de systèmes lysogènes), les bactériocines et enfin le prophage avec les conséquences de ce dernier sur le métabolisme microbien.

Dans les derniers chapitres, l'auteur s'élève à des considérations générales, traite les autres exemples d'hérédité acquise, établit des rapprochements entre bactériophages et virus et rappelle à propos de ces derniers les infections latentes à virus et le virus de la sensibilité au CO₂ chez la drosophile.

La conclusion permet de faire le point de nos connaissances actuelles et de voir les déductions que l'on en peut tirer pour l'étude des virus. Il est significatif que l'on ait vu renaître à propos de la lysogénie les mêmes querelles qui avaient autrefois séparé, lors de la découverte du bactériophage, ceux qui défendaient l'hypothèse d'un virus exogène avec d'Hérelle et ceux qui, avec Bordet et Ciuca, y voyaient un phénomène de lyse transmissible héréditaire, et il n'est pas sans intérêt de souligner que la notion actuelle de prophage, particule matérielle spécifique mais transmise héréditairement, arrive à concilier, en somme, deux positions de prime abord opposées et irréductibles.

Ce livre sera lu avec intérêt, plus encore que par les spécialistes du bactériophage à qui ces notions sont familières, par tous les microbiologistes et ceux qu'intéressent les développements d'un problème expérimental qui, en fin de compte, touche presque à la philosophie métaphysique.

M. Lépine. — J'ai l'honneur de présenter à la Société le livre que notre collègue et ami Pochon a consacré à l'analyse microbiologique du sol (1). On connaît la compétence de l'auteur en la matière et les recherches qu'il poursuit depuis de nombreuses années au laboratoire de Microbiologie du Sol à l'Institut Pasteur. La plupart des techniques qu'il décrit pour l'examen des sols ont d'ailleurs été mises au point par lui-même et ses collaborateurs. L'ouvrage est volontairement limité à l'analyse microbiologique du sol, c'est-à-dire qu'il n'est pas un manuel de microbiologie du sol et ne traite pas des techniques d'isolement des souches microbiennes. Il s'adresse avant tout à l'agronome et lui permettra de connaître l'état biologique d'un sol et d'en suivre l'évolution. Il étudie d'abord la microflore totale et les différents groupes de germes telluriques : fixateurs d'azote, ammonificateurs, nitrificateurs et dénitrificateurs, cellulolytiques, amylolytiques. Puis d'autres chapitres sont consacrés aux actinomycètes, aux champignons,

(1) J. Pochon, *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*, Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris, 1954, 123 pages. Prix : 750 fr.

aux algues, aux protozoaires, au cycle biologique du soufre, aux différents dosages à effectuer dans un sol : ceux de l'azote, du carbone, de l'humus, à l'étude du pH, etc. De nombreux graphiques expriment chaque type d'analyse et en facilitent la compréhension. Enfin, 15 comptes rendus détaillés d'analyses de terres diverses sont exposés en détail, donnant ainsi le modèle de tous les examens à effectuer. Ce livre rendra les plus grands services à tous les étudiants des Instituts et Ecoles d'Agronomie, ainsi qu'aux travailleurs de laboratoire spécialisés dans l'étude de la biologie des sols.

COMMUNICATIONS

NOUVELLES OBSERVATIONS SUR L'ACTION DE L'HYDRAZIDE DE L'ACIDE ISONICOTINIQUE (INH) DANS L'INFECTION MURINE A BACILLE DE STEFANSKY

par R. CHAUSSINAND, M. VIETTE et O. KRUG.

(Institut Pasteur. Service de la Lèpre.)

Nous avons rapporté dans deux articles les résultats obtenus en traitant par l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH) des rats inoculés avec des bacilles de Stefansky [3, 4].

Par la suite, les autopsies des animaux restés en expérimentation ont confirmé nos premières observations : l'INH n'empêche pas, mais retarde nettement l'évolution de la maladie. En effet, l'apparition de lésions au point d'inoculation, la propagation par voie lymphatique et les atteintes viscérales, lorsqu'elles existent, se révèlent toujours beaucoup plus tardives et moins importantes chez les rats traités que chez les témoins.

Cette apparition de lésions chez les animaux traités, après un temps de latence de plusieurs mois par rapport aux témoins, nous avait fait envisager la probabilité d'une résistance acquise du bacille de Stefansky à l'INH.

D'autre part, nous avons remarqué que des rats traités à partir du dix-septième jour seulement après l'inoculation présentaient des lésions moins prononcées que ceux qui avaient reçu le traitement dès le lendemain de l'inoculation. C'est ainsi que, chez un rat inoculé depuis cinq cent quarante-quatre jours et traité depuis cinq cent trente-sept jours, l'autopsie n'a montré aucune lésion macroscopique, et il n'a été trouvé à l'examen bactériologique que trois bacilles dans un frottis effectué au point d'inoculation. Cependant, les rats inoculés avec une suspension de tissus, prélevés chez cet animal, ont présenté une infection typique dans des délais sensiblement normaux.

Aussi ne pouvons-nous admettre, comme certains auteurs, que l'INH, même administré à des doses très élevées, puisse supprimer radicalement l'infection à bacille de Stefansky.

Ces observations ont été confirmées par une nouvelle expérimentation dont nous rapportons ici les résultats.

I. RÉSISTANCE DU BACILLE DE STEFANSKY A L'INH. — On injecte par voie sous-cutanée à 30 rats 1 cm³ d'une suspension de bacilles de Stefansky dont une goutte étalée montre environ 40 bacilles par champ microscopique. Ces germes provenaient d'une lésion apparue chez un animal traité par l'INH. 10 rats sont gardés comme témoins, 10 sont traités dès le lendemain et 10, à partir du dix-septième jour après l'inoculation.

Les lésions au point d'inoculation sont apparues chez les témoins dès le troisième mois, c'est-à-dire dans des délais normaux, vers le quatrième mois chez les rats traités le lendemain de l'inoculation et avant le cinquième mois chez ceux qui n'avaient reçu l'INH qu'après dix-sept jours. Il y a donc eu un léger retard chez les animaux traités par rapport aux témoins, mais ce retard était beaucoup plus court que chez les animaux de nos premières expériences, inoculés avec des bacilles n'ayant jamais été en contact avec l'INH.

Dans la propagation de l'infection et son extension aux viscères, nous n'avons noté que peu de différences entre témoins et animaux traités. Toutefois, parmi ces derniers, les rats qui n'avaient reçu l'INH qu'après dix-sept jours paraissaient plus légèrement infectés. Le foie et la rate étaient moins fréquemment atteints et les bacilles s'y révélaient moins nombreux.

Il est à noter que les lésions au point d'inoculation provoquées par les bacilles de Stefansky INH-résistants se montraient parfois beaucoup plus importantes que celles produites par des bacilles normaux.

Il apparaît donc que l'administration quotidienne d'INH par voie buccale, à raison de 10 mg par kilogramme de poids, non seulement ne supprime pas l'infection, mais détermine l'apparition d'un état de résistance de l'agent pathogène envers le médicament.

Bushby et Barnett ont également constaté que l'INH était sans action appréciable chez les souris inoculées avec des bacilles de Stefansky provenant d'animaux traités par ce produit [2]. De même Nishimura a observé que le bacille de Stefansky pouvait acquérir une résistance à l'INH [6].

Et. Bernard, Kreis et M^{me} Brun d'une part [4], Nigoghossian [5] et Petit [7] d'autre part, ont signalé que l'INH-résistance du bacille de Koch, apparue au cours du traitement, présentait parfois une certaine labilité après l'arrêt de celui-ci. Aussi a-t-il été proposé d'instituer de courtes périodes de traitement, séparées par des intervalles d'abstention thérapeutique.

Nous avons essayé cette méthode chez 35 rats, inoculés par voie sous-cutanée avec 1 cm³ d'une suspension de bacilles de Stefansky dont une goutte étalée contenait plusieurs centaines de germes par champ microscopique. Ces bacilles n'avaient jamais été en contact avec l'INH. 10 rats ont été traités de façon continue et 5, gardés comme témoins. Les 20 rats restants sont traités pendant des périodes

de trois mois, séparées par des intervalles de repos, d'un ou de deux mois. Tous les animaux ont été infectés, mais les lésions paraissaient moins marquées chez les rats dont le traitement avait été interrompu par des périodes de repos d'un mois.

II. COMPARAISON ENTRE L'ACTION DES TRAITEMENTS DÉBUTANT PLUS OU MOINS LONGTEMPS APRÈS L'INOCULATION. — 35 rats sont inoculés par voie sous-cutanée (1 cm³ d'une suspension montrant environ 40 bacilles par champ microscopique) : 5 sont gardés comme témoins, 10 sont traités le lendemain de l'inoculation, 10 après dix-sept jours, et 10 après trente jours. L'infection s'est développée plus rapidement et d'une manière beaucoup plus intense chez les témoins. Leur survie moyenne a été de deux cent douze jours. Chez les rats traités, soit après vingt-quatre heures, soit après dix-sept ou trente jours, ces moyennes ont été respectivement de 266,4 jours, 312,7 jours et 239,3 jours. Les lésions cliniques au point d'inoculation sont apparues plus précocement dans le groupe traité dès l'inoculation. D'autre part, les autopsies des animaux de ce groupe ont montré une extension aux viscères plus fréquente et une propagation par voie lymphatique plus prononcée que dans les groupes traités tardivement. Parmi ceux-ci, les animaux traités après trente jours ont présenté des lésions plus marquées que ceux qui l'ont été après dix-sept jours. Le traitement par l'INH paraît donc donner les meilleurs résultats chez le rat infecté par le bacille de Stefansky lorsqu'il n'est institué que dix-sept jours environ après l'inoculation.

III. ACTION DES DOSES ÉLEVÉES D'INH, ADMINISTRÉES PAR VOIE SOUS-CUTANÉE. — 40 rats sont inoculés par voie intramusculaire avec 0,2 cm³ d'une suspension extrêmement riche en bacilles : 10 servent de témoins, 10 sont traités par voie buccale et les 20 autres, par voie sous-cutanée. Alors que la tolérance maxima par voie buccale était de 10 mg par kilogramme et par jour, la dose administrée par voie sous-cutanée a pu être portée à 25 mg et même à 50 mg.

Le groupe traité par voie buccale a été nettement le plus infecté. Les rats soumis aux injections sous-cutanées quotidiennes de 50 mg par kilogramme de poids étaient les moins atteints. La recherche des bacilles a été plus faiblement positive au point d'inoculation et dans les ganglions superficiels et, dans aucun cas, des bacilles n'ont été trouvés dans le foie et la rate. Cependant, un début de propagation par voie lymphatique a été noté et la survie n'a pas été plus longue que celle des rats traités par voie buccale. Dans notre expérience, l'INH, même administré par voie sous-cutanée à doses très élevées n'a donc pas supprimé l'infection.

CONCLUSIONS. — Le bacille de Stefansky acquiert, chez le rat traité par l'hydrazide de l'acide isonicotinique (INH), une résistance à ce produit.

Chez les animaux inoculés avec des bacilles INH-résistants, le traitement est pratiquement sans action.

Le traitement par l'INH, institué dix-sept jours après l'inoculation est plus efficace que lorsqu'il débute aussitôt après celle-ci.

D'autre part, les lésions paraissent moins marquées quand les ani-

maux sont traités pendant des périodes de trois mois, séparées par des intervalles de repos d'un mois.

Le traitement par voie sous-cutanée, mieux toléré par le rat que le traitement buccal, permet d'administrer quotidiennement jusqu'à 50 mg par kilogramme de poids. Mais, même à cette dose, l'INH ne semble pas supprimer l'infection.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Et. BERNARD, B. KREIS et M^{me} BRUN. *Rev. Tuberc.*, 1953, **17**, 237.
- [2] S. R. BUSHBY et M. BARNETT. *Intern. J. Leprosy*, 1953, **21**, 467.
- [3] R. CHAUSSINAND, M. VIETTE et O. KRUG. *Ces Annales*, 1953, **84**, 431.
- [4] R. CHAUSSINAND, M. VIETTE, G. DEZEST et O. KRUG. *Ces Annales*, 1953, **85**, 398.
- [5] G. A. NIGOGHOSSIAN. *Schweiz. med. Wsch.*, 1953, **83**, 218.
- [6] S. NISHIMURA. XXVI^e Congrès Annuel de l'Association Japonaise de la Lèpre. Avril 1953.
- [7] A. PETIT. *Schweiz. med. Wsch.*, 1953, **83**, 754.

CONSIDÉRATIONS SUR LA DURÉE ET LE MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ ENGENDRÉE PAR LE VIRUS DU FIBROME DE SHOPE CONTRE LE VIRUS DU MYXOME DE SANARELLI

par H. JACOTOT, A. VALLÉE et B. VIRAT.

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale.)

Si les propriétés du virus de Sanarelli et du virus du fibrome de Shope ont été bien étudiées déjà, nos connaissances sur l'emploi du second dans l'immunisation des lapins contre le premier sont encore très incomplètes. C'est que, jusqu'au jour où se fut constitué en France un foyer de myxomatose, cette maladie apparaissait comme un auxiliaire éventuel dans la lutte contre la pullulation des lapins sauvages en certaines régions plutôt que comme une contagion redoutable pour les hôtes des clapiers.

L'étude que nous poursuivons depuis deux ans de cette méthode de vaccination très spéciale nous a permis de réunir des précisions sur certains points qui la concernent.

I. DURÉE DE L'IMMUNITÉ. — On sait que l'immunité s'établit rapidement dans les jours qui suivent l'inoculation du virus du fibrome, mais sa durée est mal connue. Nos premiers essais de vaccination datent de mars 1953 et nous avons conservé, pour des épreuves échelonnées dans le temps, un certain nombre de lapins inoculés alors, ou dans les mois suivants, avec du virus de Shope. Nous avons pu

constater qu'un grand nombre d'entre eux offraient, dix ou douze mois après, la même résistance au virus du myxome que les sujets vaccinés en même temps qu'eux et qui avaient été éprouvés dans de courts délais.

TABLEAU I.

	Nos des lapins	Date de la vaccination	Importance de la lésion vaccinale	Intervalle entre vaccination et épreuve	Suites de l'épreuve	Comportement des témoins d'épreuve
I	315	17.4.53	2 mm	12 jours	Mort en 17 j.	331 mort en 15 jours
	307	"	8 mm	"	Résiste sans troubles	
	410	"	10 mm	10 mois 1/2	Résiste-eschare	415 mort en 15 jours
	411	"	8 mm	"	Résiste-eschare	
	412	"	10 mm	"	Résiste-nodules	
	306	"	10 mm	"	Mort en 19 j.	
II	330	24.4.53	Infiltration	4 mois	Mort en 10 j.	384 mort en 12 jours
	836	"	Infiltration	"	Résiste-nodules	
	849	"	6 mm	6 mois	Mort en 24 j.	8587 mort en 11 jours
	432	"	4 mm	12 mois	Résiste-nodules	459 mort en 13 jours
	815	"	5 mm	"	Résiste-nodules	
III	858	3.7.53	18 mm	6 jours	Résiste-eschare	385 mort en 12 jours
	859	"	5 mm	"	Résiste sans troubles	
	863	"	5 mm	9 mois 1/2	Résiste-eschare	460 mort en 13 jours
	864	"	8 mm	"	Mort en 19 j.	

Les trois exemples condensés dans le tableau ci-joint sont assez expressifs ; dans les deux premières expériences on a employé du virus de souche OA ; dans la troisième, du virus de souche Boerläge. Les vaccinations ont été faites par injections sous-cutanées de suspensions de fibrome, les épreuves par inoculations sous-cutanées de suspensions de myxomes.

Il n'est donc pas douteux que l'inoculation du virus de Shope est susceptible de protéger les lapins pour longtemps contre la myxomatose ; et lorsque l'immunité se révèle défaillante quelques mois après la vaccination, on est en droit de penser, le plus souvent, qu'à aucun moment elle n'avait été de haute qualité. Le pouvoir immunigène du virus du fibrome vis-à-vis de celui du myxome varie d'une souche à l'autre ; et l'on a des raisons de penser que, dans la même souche il ne demeure pas toujours semblable à lui-même. D'autre part l'aptitude des lapins à tirer profit des propriétés du virus de Shope varie plus ou moins d'un individu à l'autre ; dans un groupe d'animaux semblables, immunisés de la même façon, on peut en observer qui résistent presque parfaitement à l'épreuve alors que d'autres y succombent à peu près exactement comme les témoins. Ce sont là autant de causes d'erreur dans l'estimation de la durée des effets du virus de Shope.

II. MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ. — Deux constatations s'imposent à l'évidence : a) il n'y a pas de rapport direct entre l'importance du fibrome et le degré de protection contre le myxome ; b) l'état d'immunité vis-à-vis du virus du myxome peut subsister après dispa-

rition de la lésion développée au point d'inoculation du virus de Shope.

a) Après les centaines de milliers de vaccinations qui ont été pratiquées en France depuis dix-huit mois, il est de notion courante que nombre de lapins porteurs de fibromes vaccinaux gros comme des noix, des dattes, voire même des œufs, ont contracté une myxomatose très grave ou même mortelle. Inversement nous avons pu constater, et notamment sur les premiers lapins que nous avons vaccinés, en février 1953, que l'absence totale, ou apparemment telle, de réaction fibromateuse était compatible avec l'installation d'une forte immunité. L'exemple suivant choisi parmi d'autres illustre la discordance. Les lapins 4471 et 270 reçoivent d'abord, chacun, 0,5 cm³ de vaccin dans le tissu conjonctif sous-cutané derrière l'épaule ; le premier résorbe le vaccin sans réaction, le deuxième fait un fibrome de la grosseur d'une amande. Trois semaines après la vaccination on les éprouve par inoculation sous-cutanée de virus de Sanarelli ; le premier contracte une myxomatose atténuée, nodulaire, et guérit, le deuxième une myxomatose mortelle en dix jours.

Pour la pratique des vaccinations il est, certes, désirable que l'inoculation du virus de Shope soit suivie de la formation d'une lésion *in situ*, car cette lésion apporte la preuve de la vitalité du virus ; mais de son existence et de son importance on n'est pas autorisé à inférer l'établissement d'un état d'immunité non plus que le degré de cette immunité. Cette dissociation de deux propriétés très importantes du virus du fibrome, l'aptitude à provoquer l'élaboration sur place d'une lésion anatomique caractérisée et le pouvoir de prémunir l'organisme contre les effets du virus de Sanarelli, n'est pas l'un des aspects les moins troublants du problème que pose cette vaccination.

En ce qui concerne les sujets qui ne présentent aucune réaction locale à la suite de la vaccination, on ne peut, bien entendu, écarter l'hypothèse qu'ils édifient ailleurs une tumeur, plus ou moins discrète, échappant à l'examen ; mais cette restriction n'infirme pas la notion de dissociation sur laquelle nous avons voulu insister.

b) Ici deux constatations essentielles. Aucun des lapins que nous avons éprouvés tardivement et qui ont résisté totalement ou partiellement à l'inoculation virulente (une quinzaine au total, qui avaient été vaccinés de six mois à douze mois auparavant), aucun de ces animaux ne portait la moindre trace de réaction vaccinale dans la région où l'on avait déposé en son temps le virus de Shope.

D'autre part, nous avons observé que des lapins inoculés de fibrome dans les testicules et que l'on soumettait ensuite à la castration demeuraient hautement résistants au virus de Sanarelli. Exemple : les lapins 914 et 916 ont reçu chacun dans chaque testicule 1 cm³ d'une suspension au 1/200 de virus de Shope ; ils ont fait l'un et l'autre une orchite double ; une semaine après l'inoculation, alors que les glandes sont en pleine réaction fibromateuse, on les résèque ainsi que la partie infiltrée du scrotum. Trois semaines plus tard on éprouve ces lapins par inoculation de virus de Sanarelli ; le premier reste totalement indifférent, le deuxième ne répond que par une légère inflammation locale suivie de la formation d'une petite eschare

cutanée. Ce sont là, d'ailleurs, des cas extrêmes et tous les animaux ainsi traités n'ont pas le même comportement ; dans l'exemple ici rapporté six autres lapins avaient été soumis au même protocole ; chez trois d'entre eux la myxomatose a évolué dans une forme classique, mortelle avec un retard appréciable, les trois autres ont fait une maladie nodulaire avec manifestations inflammatoires bénignes puis guérison. On conçoit que dans le court laps de temps qui s'est écoulé entre le jour de l'inoculation et le jour de la résection, une semaine, l'immunité n'ait pu que s'ébaucher chez plusieurs de ces animaux.

EN RÉSUMÉ. — L'immunité conférée au lapin par le virus du fibrome infectieux (souche OA et souche Boerläge) contre le virus du myxome infectieux est une immunité de longue durée (probablement de l'ordre d'une année) ; il n'y a pas de rapport constant entre l'importance du fibrome vaccinal et le degré ou la persistance de l'immunité contre le myxome ; l'état d'immunité vis-à-vis du myxome n'est pas lié à la présence d'une lésion au point d'inoculation du fibrome.

ÉTUDE COMPARATIVE DE LA SOUCHE TOXIGÈNE DE *BACILLUS CEREUS* VAR. *SOTTO* (ISHIWATA) AGENT PATHOGÈNE DE LA FLACHERIE DES VERS A SOIE AU JAPON

par C. TOUMANOFF.

(Institut Pasteur.)

Dans une note antérieure nous avons précisé les caractéristiques de *Bacillus sotto* Ishiwata qui nous a été envoyé du Japon en 1949 [1].

L'étude détaillée de cette souche bactérienne nous a conduit à la conclusion qu'elle doit être rattachée à l'espèce *cereus* et nous l'avons désignée sous le nom de *B. cereus* var. *sotto*.

Dans la même communication nous avons comparé ce bacille avec deux souches de *B. thuringiensis* Berliner, l'une d'origine allemande (reçue du Dr Steinhaus) et l'autre d'origine française provenant de la collection de M. Metelnikov.

Nous avons conclu que ces souches devaient également être rapportées au genre *cereus* et que la dénomination *B. cereus* var. *thuringiensis* paraissait plus légitime à l'égard de ces souches que la désignation spécifique.

La souche de *B. sotto* reçue du Japon en 1949 a été enfin comparée à *Bacillus cereus* var. *alesti* et son action pathogène fut éprouvée sur les vers à soie [2].

Nous avons démontré, avec M. Vago que cette souche de *sotto* était pour ainsi dire complètement avirulente pour les vers, comparée

à *B. cereus* var. *alesti* utilisée dans les mêmes conditions, et à la même dose.

Au début de l'année 1954, nous avons obtenu du Japon une nouvelle souche de *B. sotto* virulente pour les vers et dont l'effet sur ces insectes fut comparable à celui décrit par Aoki et Chigasaki [3] pour la souche qu'ils ont désignée comme *B. sotto* toxigène. On peut ainsi admettre que la première souche que nous avons reçue et qui s'est avérée presque avirulente pour les vers est celle désignée par ces auteurs comme « atoxigène » [4].

La comparaison de cette nouvelle souche avec celle antérieurement décrite s'imposait, afin de reconnaître la possibilité de leur différenciation en milieu de culture.

Voici la description de *Bacillus cereus* var. *sotto* virulent :

Du point de vue morphologique, les formes végétatives ressemblent à celles de la souche avirulente se présentant, en cultures jeunes sous formes de filaments enchevêtrés, qui ont tendance à se dissocier dans les cultures plus âgées. La formation des spores est identique, caractéristique pour *cereus*, mais les inclusions cristallines signalées chez la plupart des *cereus* entomophytes décrits par Hannay, Angus et Steinhau [5, 6, 10] chez la souche toxigène n'ont pas été observées chez la souche atoxigène.

La culture sur gélose se présente sous un aspect terne, cireux, légèrement plus foncé que dans le cas de la souche avirulente.

La gélatine est liquéfiée totalement en vingt-quatre heures, cette liquéfaction par la souche atoxigène étant bien plus lente. Sur la gélose glucosée au rouge neutre on observe une croissance abondante tout le long du tube, sans modification du milieu, et ce n'est que le septième jour qu'apparaît une légère fluorescence verte, qui persiste jusqu'au quinzième jour ; il n'y a pas de virage au jaune rapide, comme chez la souche atoxigène, ni de production de gaz.

Sur le sérum coagulé une culture dense, brillante, d'un blanc verdâtre avec légère digestion en surface du milieu ; digestion importante le quatrième jour, qui s'intensifie le septième jour de culture, et devient totale ou quasi-totale du quinzième au vingtième jour de culture. La digestion du milieu par la souche avirulente n'est que très faible le quinzième jour.

Gélose au sang : pas d'hémolyse, la souche avirulente produisant l'hémolyse apparente.

Lait tournesolé : virage au mauve rose au bout de quarante-huit heures, digestion totale du milieu le quatrième jour avec liquide surnageant rosé. Avec la souche avirulente une digestion incomplète du lait le cinquième jour, sans modification de teinte du milieu.

Petit lait tournesolé : le phénomène de caméléonage très marqué, virage au violet rosé au bout de vingt-quatre heures, persistance de la couleur rose le quatrième jour, virage au mauve le septième jour, puis passage au bleu violet est bien marqué. Souche avirulente : décoloration complète en soixante-douze heures, retour au bleu primitif vers le cinquième jour.

Le germe est anaérobie facultatif. Sur gélose au sous-acétate de plomb pas de modification. Pas d'action sur les glucides suivants : mannite, xylose, arabinose, lactose, galactose, inositol, adonite, sorbite. Sont fermentés en vingt-quatre heures : maltose, lévulose, saccharose et glucose. Fermentation rapide de maltose comparée avec la souche avirulente.

La souche produit l'acétylméthylcarbinol. Les nitrites sont formés à partir des nitrates. Pas d'indol.

La catalase est produite.

Sur le milieu haricot saccharosé ; pH 7 et 6, aspect trouble, forte croissance, pas de pellicule.

La croissance sur la gélose au jaune d'œuf produit le blanchiment rapide caractéristique des *cereus* sur la suspension de jaune d'œuf ; on observe le blanchiment et le durcissement *sans formation de pigment*.

Le taux de la sensibilité aux antibiotiques, établi par la méthode

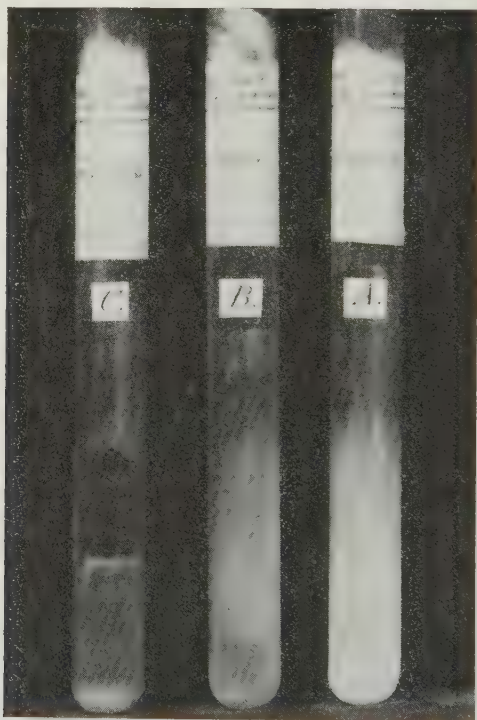


FIG. 4. — Culture de quinze jours sur sérum coagulé de : A, *B. cereus* var. *thuringiensis*; B, *B. cereus* var. *alesti*; C, *B. cereus* var. *sotto*, souche virulente.

des disques de l'Institut Pasteur pour la souche virulente (SV) et avirulente (SA), est de :

Pénicilline : SV (Résistant), SA (R) ; Terramycine : SV (7,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$), SA (9 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) ; Chloromycétine : SV (7 μg), SA (10 μg) ; Auréomycine : SV (2 μg), SA (4,6 μg) ; Streptomycine : SV (3,8 μg), SA (1,1 μg) ; Tétracycline : SV (1 μg), SA (1,3 μg) ; Erythromycine : SV (0,36 μg), SA (0,24 μg) ; Bacitracine : SV (5,8 μg), SA (3,4 μg) ; Néomycine : SV (diam/mm 27), SA (diam/mm 28) ; Framycétine SV (diam/mm 22), SA (diam/mm 26).

Dans des publications antérieures, il était indiqué que *B. cereus*

var. *alesti* ne saurait être confondu avec *B. cereus* var. *sotto* ou var. *thuringiensis*, grâce à la production par cette première variété d'un pigment rouge dans la suspension du jaune d'œuf ou la gélose au jaune d'œuf [9].

La confusion demeurerait cependant possible entre *B. cereus* var. *sotto* et *B. cereus* var. *thuringiensis*, tous les deux morphologiquement semblables, possédant les inclusions cristallines de Hannay [5], la première étant cependant sensiblement plus toxique pour les vers à soie que la seconde (1).

Les ensemencements répétés de ces trois souches de *cereus* entomophytes sur le milieu au sérum coagulé ont montré que *B. cereus* var. *thuringiensis* n'exerçait qu'un effet très faible sur ce milieu (fig. 1, tube A), sur lequel il pousse très bien sans modifier d'une manière appréciable son aspect, soit en le digérant très faiblement, soit sans l'attaquer ; que *B. cereus* var. *alesti* digérait, généralement la surface du milieu en modifiant sa teinte, qui devient verdâtre avec accumulation dans le fond du tube d'une quantité limitée de liquide provenant de la digestion (fig. 1, tube B) et qu'enfin *B. cereus* var. *sotto* virulent ou « toxigène » attaquait très fortement le sérum et le digérait soit totalement, soit en grande partie (fig. 1, tube C).

Il résulte de ces indications que la souche virulente ou « toxigène » d'Aoki et Chigasaki [3] de *Bacillus cereus* var. *sotto* peut être distinguée de la souche « atoxigène » des mêmes auteurs [4] du point de vue morphologique par la présence, dans les formes végétatives de la première, des inclusions cristallines décrites par Hannay qui, dans cette souche, ont du reste été déjà signalées par Angus [6]. Du point de vue biochimique, la souche virulente se distingue de la non virulente par sa forte action protéolytique.

Cette propriété permet également de différencier la forme virulente de *B. cereus* var. *sotto* de *B. cereus* var. *thuringiensis*, cette dernière variété montrant d'autre part une résistance particulière à l'égard de certains antibiotiques *in vitro* [7].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. TOUMANOFF. Ces Annales, 1952, **82**, 512.
- [2] C. TOUMANOFF et C. VAGO. Ces Annales, 1952, **83**, 634.
- [3] K. AOKI et V. CHIGASAKI. Mitt. der Med. Fak. der Kais. Univ. zu Tokyo, 1915, **14**, 59.
- [4] K. AOKI et V. CHIGASAKI. Bull. Imp. Seric. Exp. Stat., 1916, **1**, 141.
- [5] C. L. HANNAY. Nature, 1953, **172**, 1004.
- [6] T. A. ANGUS. Nature, 1954, **173**, 545.
- [7] C. TOUMANOFF et M. LAPIED. Ces Annales, 1954, **87**, 370.
- [8] C. TOUMANOFF. Ces Annales, 1953, **85**, 90.
- [9] C. TOUMANOFF. Ces Annales, 1954, **87**, 486.
- [10] E. STEINHAUS et E. JERREL. Hilgardia, 1954, **23**, 1.

(1) Les résultats d'essais comparatifs concernant la rapidité de l'action toxique de ces trois souches, effectués avec M. Vago, sont relatés dans une publication spéciale.

SUR LA VIRULENCE VIS-A-VIS DU VER A SOIE DE QUELQUES *CEREUS* ENTOMOPHYTES EN TANT QUE TEST DE COMPARAISON

par C. TOUMANOFF et C. VAGO.

(Institut Pasteur de Paris et Laboratoire
de Pathologie Comparée des Invertébrés.
Station de Recherches d'Alès [I. N. R. A.])

Dans un travail antérieur, nous avons comparé l'effet de diverses souches bactériennes entomophytes sur les vers à soie [4].

Cette étude avait surtout pour but de préciser l'action, à une dose déterminée et plutôt réduite, des germes du groupe *cereus*.

Elle a fait ressortir la virulence prononcée pour *Bombyx mori* L., à cette dose très faible, de l'agent pathogène de la flacherie infectieuse [8, 9] comparée à celle d'autres souches. D'autre part, il a été signalé que *B. cereus* var. *thuringiensis* et *B. cereus* var. *sotto* n'ont qu'un effet modéré sur les vers, provoquant une mortalité tardive et partielle.

Nous avons continué ces essais en augmentant progressivement dans des proportions importantes la concentration de la suspension infectante, afin d'arriver à la discrimination chiffrée de la virulence chez les diverses souches.

Au cours de la première série d'essais, la virulence de *B. cereus* var. *alesti* et *B. cereus* var. *sotto* a été comparée sur 800 individus tests.

Nous avons employé une souche de *B. sotto* différente de celle de nos essais antérieurs. En effet, la première souche reçue du Japon et étudiée par l'un de nous en 1952 était, d'après les renseignements obtenus, celle qui provoque dans ce pays la mortalité dans les magnaneries et aussi dans les conditions expérimentales [6]. Or nos premiers essais avec cette souche ayant donné des résultats incertains, nous avons reçu l'assurance qu'il existait au Japon une autre souche virulente pour les vers à soie. Celle-ci nous fut envoyée en 1954.

A doses fortes, *B. cereus* var. *sotto* s'avère toxique pour les vers. La mortalité est cependant moins rapide qu'à la suite de la contamination des vers par *cereus* var. *alesti*.

A doses plus diluées, la différence est telle qu'il peut y avoir non-mortalité avec *sotto*, alors qu'elle est importante avec *alesti*.

Les essais comparatifs d'infection des vers par *B. cereus* var. *alesti* et *B. thuringiensis* sont exprimés par les trois courbes (A, B et C, fig. 1) de concentration : 400 000 000, 20 000 000 et 4 000 000 de germes par centimètre cube environ.

Comme on peut en juger par ces courbes, la mortalité, à la suite de l'ingestion d'une dose massive de *B. thuringiensis*, peut se mani-

fester six heures après le repas infectant et atteindre, avant vingt-quatre heures, près de 100 p. 100 ; à une dose plus faible, on n'enregistre aucune mortalité avant quarante-deux heures et elle n'atteint à ce moment que 20 p. 100 des insectes en expérience.

Enfin, l'ingestion d'une dose faible provoque la mort de 10 p. 100

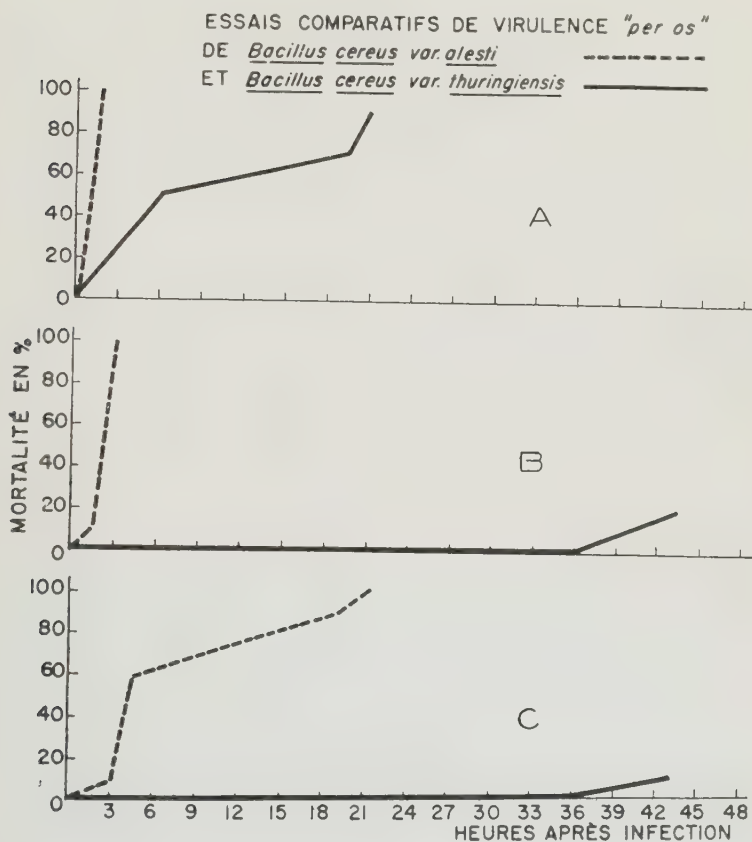


FIG. 4.

seulement des individus au bout de quarante-cinq heures ; la mortalité de 100 p. 100 étant observée pour la même dose avec *B. cereus* var. *alesti* au bout de vingt et une heures.

Nos expériences confirment tout d'abord, comme celles d'Angus [2], la virulence d'une souche de *B. cereus* var. *sotto* [3], et une fois de plus les constatations d'Aoki et Chigasaki que nous n'avons jamais manqué de rapporter dans nos publications [4, 5].

Nos expériences sont d'autant plus significatives qu'elles ont été effectuées sur des chenilles vigoureuses, élevées dans des conditions

qui ne peuvent être réalisées que dans les régions d'élevage de vers à soie.

Il ressort de nos essais que la toxicité des souches entomophytes de *B. cereus* dénommées *alesti*, *sotto* et *thuringiensis* va en décroissant pour les vers à soie dans l'ordre ci-dessus, le *thuringiensis* étant

TABLEAU I. — Essais comparatifs de virulence vis-à-vis de *Bombyx mori* L. 4^e âge, t. : 20° C, H. : 60 p. 100.

Lots de 100 individus.

	400 000 000 éléments pour 1 cm ³ environ	40 000 000 éléments pour 1 cm ³ environ	8 000 000 éléments pour 1 cm ³ environ	4 000 000 éléments pour 1 cm ³ environ
I. — <i>Bacillus cereus</i> var. <i>alesti</i>				
2 heures.	62	45	8	4
4 heures.	100	100	60	51
12 heures.	—	—	100	100
24 heures.				
48 heures.				
II. — <i>Bacillus sotto</i> , envoi du Japon 1954				
2 heures.	4	0	0	0
4 heures.	36	41	42	0
12 heures.	62	36	24	0
24 heures.	100	71	60	0
48 heures.	—	80	78	0

moins actif sur *Bombyx mori* que les germes spécifiques, ce qui n'est pas étonnant, car cette dernière variété provenait de la mite de la farine *Ephestia kühniella* Hübn., dont le mode d'existence et le métabolisme sont tout à fait différents.

Bacillus cereus var. *alesti* pouvant être distingué par son action spéciale sur la suspension de jaune d'œuf aussi bien de *B. cereus* var. *sotto* que de *B. cereus* var. *thuringiensis* [4, 5], on pourrait différencier la forme virulente *sotto* récemment reçue du Japon de *thuringiensis* par son effet toxique plus manifeste sur les vers à soie.

Ces essais montrent en outre que les souches de *cereus* entomophytes difficiles et parfois impossibles à distinguer les unes des autres tant du point de vue morphologique que de celui du comportement sur les milieux de culture, manifestent souvent une individualité marquée quant à leur action pathogène pour les insectes.

Il ne nous semble donc pas justifiable de chercher à couvrir par un seul nom spécifique toutes ces formes.

Bien au contraire, il serait plus prudent de les considérer comme variétés de cette espèce, adaptées au parasitisme, jusqu'à ce que leur action sur les hôtes différents soit précisée et leurs affinités réelles établies. Nous attirons l'attention, comme suite à nos recherches discriminatives dont une partie est relatée dans cette note, sur l'intérêt

que pourraient présenter les souches entomophytes de *cereus* dans l'étude comparée de la spécialisation de la virulence bactérienne vis-à-vis d'une espèce hôte.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *Ces Annales*, 1952, **83**, 634.
- [2] T. A. ANGUS. *Nature*, 1954, **173**, 545.
- [3] K. AOKI et Y. CHIGASAKI. *Mitt. Med. Fak. Kais. Univ. Tokio*, 1915, **14**, 59.
- [4] C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1953, **85**, 90.
- [5] C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1954, **87**, 486.
- [6] C. TOUMANOFF. *Ces Annales*, 1952, **82**, 512.
- [7] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1504.
- [8] C. VAGO. *C. R. Acad. Agric.*, 1951, **37**, 593.
- [9] C. TOUMANOFF et C. VAGO. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1504.

TRAITEMENT PAR LES AMMONIUMS QUATERNAIRES DES PRODUITS PATHOLOGIQUES POUR L'ISOLEMENT DU BACILLE TUBERCULEUX

par J. VIALIER et M^{lle} J. AUGAGNEUR.

(*Institut Pasteur, Lyon.*)

Nous avons étudié précédemment [1, 2] l'action de certains ammoniums quaternaires sur les mycobactéries. Mettant à profit la différence de sensibilité à ces substances des mycobactéries pathogènes et des autres germes, nous les avons utilisées pour traiter, avant ensemencement, les produits pathologiques. F. Tison et A. Loze [3], F. Tison [4], ont étudié l'action de l'alcoylsulfate de sodium et préconisent une méthode de traitement des produits pathologiques par ce corps et l'acide sulfurique dilué.

Dans une première série de recherches, nous avons utilisé le méthosulfate de méthyl-phényl-dodécyl-triméthyl-ammonium à la concentration de 1 p. 100 ou 1 p. 1 000 pour traiter 125 produits pathologiques (expectorations ou pus). Le temps de contact (1 cm³ de produit pour 5 cm³) a varié de soixante à cent vingt minutes. Comparativement, les mêmes produits ont été ensemencés après traitement par l'acide sulfurique à 15 p. 100, puis neutralisation selon la méthode classique. Les résultats furent les suivants :

17 cas : concordance entre les cultures positives par les deux méthodes.

3 cas : ammonium quaternaire, cultures positives, acide sulfurique, cultures négatives.

10 cas : ammonium quaternaire, cultures négatives, acide sulfurique, cultures positives.

Ces derniers cas correspondaient à un traitement trop long ou à une concentration trop forte.

Une deuxième série de 245 produits (en majorité expectorations ou liquides de tubages gastriques, rares pus et liquides pleuraux) a été traitée comparativement par l'acide sulfurique et le méthosulfate de méthyl-phényl-dodécyl-triméthyl-ammonium, dilué au 1 p. 1 000 à raison de 0,5 à 1 cm³ de produit pathologique pour 5 cm³. Le mélange est agité puis laissé en contact quatre-vingt-dix minutes, jusqu'à la fin d'une première centrifugation. Le culot est alors lavé deux fois à l'eau distillée stérilisée puis ensemencé sur un seul milieu de Lœwenstein.

Le produit traité par l'acide a été ensemencé sur 2 milieux de Lœwenstein et 1 milieu de Dubos.

Dans ces conditions, la méthode classique nous a donné :

75 cultures positives.

L'emploi du triméthyl-ammonium a donné :

58 cultures positives.

En réalité, dans 52 cas, il y a eu concordance entre les deux méthodes.

Vingt-trois ensemencements ont poussé après traitement par la méthode classique et sont restés stériles par l'autre technique. Mais 2 n'avaient poussé qu'en Dubos, et 13 n'avaient donné que 1 ou 2 colonies au plus sur 1 seul milieu de Lœwenstein.

Six ensemencements ont poussé après traitement par l'ammonium quaternaire, alors que la portion traitée par l'acide sulfurique est restée stérile.

Parmi les ensemencements, 14 traités par l'ammonium quaternaire ont donné naissance à des colonies de microbes ou de levures ne permettant pas d'utiliser les milieux. Il s'agissait de tubages gastriques. Tous ces ensemencements se révélèrent contaminés par la méthode classique ainsi que dix autres. Aucun ensemencement ne donna naissance à des colonies de mycobactéries non pathogènes.

Les colonies de bacilles isolés après traitement par le triméthyl-ammonium ont un aspect identique à celles obtenues par la méthode classique. Elles ne sont pas d'apparition plus précoce et ne nous ont pas paru plus nombreuses.

Nous avons voulu vérifier si la sensibilité aux antibiotiques subissait des modifications par suite du traitement préalable.

La sensibilité à la streptomycine, à l'isoniazide, au PAS a été recherchée pour 48 souches obtenues par la méthode à l'acide et les 48 souches correspondantes obtenues par l'autre technique.

Pour 30 souches, il y eut concordances absolues pour les sensibilités à chacun des 3 antibiotiques.

Pour 18 souches, nous avons noté une discordance pour 1 ou 2 antibiotiques.

Pour la *streptomycine*, 4 discordances non systématisées donnèrent une souche sensible pour l'un des deux isolements, alors que la souche correspondante était résistante à plus de 20 µg.

Pour l'*isoniazide*, nous avons trouvé 3 discordances, l'une des 2 souches correspondantes étant sensible, l'autre résistante.

Pour le PAS, 11 discordances : 7 souches isolées par l'acide, 3 souches

par le triméthyl-ammonium furent trouvées résistantes à plus de 100 µg alors que la souche correspondante était sensible. Ces discordances non systématisées peuvent s'expliquer par le fait que les parcelles purulentes prélevées pour chacun des deux traitements n'étaient pas équivalentes.

Le traitement des produits pathologiques par le méthosulfate de méthyl-phényl-dodécyl-triméthyl-ammonium à la concentration de 1 p. 1 000 en vue de l'isolement du bacille tuberculeux, par cultures sur milieu solide, nous a donc donné, dans les conditions où nous nous sommes placés, des résultats, très légèrement inférieurs sinon équivalents à ceux de la méthode à l'acide sulfurique. Il s'agit du reste d'une comparaison, une imperfection momentanée de l'une ou l'autre technique pouvant très facilement faire varier le faible écart de la positivité des résultats entre l'une et l'autre.

Un lavage plus soigneux du culot de centrifugation, lorsqu'on utilise le triméthyl-ammonium, devrait améliorer les résultats pour les produits très paucibacillaires.

Un inconvénient de la méthode réside dans la difficulté de l'homogénéisation du culot de centrifugation, s'il s'agit de produits très purulents.

Les caractères des bacilles isolés ne sont pas modifiés par le contact avec l'ammonium quaternaire et en particulier, les sensibilités aux antibiotiques des souches isolées par chacune des deux méthodes restent comparables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. VIALIER et M^{lle} J. AUGAGNEUR. *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1423.
- [2] J. VIALIER, A. BERTOYE, M. CARRAZ et A. COURTIEU. 1^{er} Congrès de la Détergence, Paris, septembre 1954.
- [3] F. TISON et A. LOZE. *Ces Annales*, 1954, **87**, 445
- [4] F. TISON. *Ces Annales*, 1954, **87**, 735.

TRANSMISSION DES VIRUS DE LA MALADIE DE NEWCASTLE ET DE LA VARIOLE AVIAIRE A LA ROUSSETTE (*SCYLLIUM CANICULA*)

par PASCU ATANASIU et IRÈNE ATANASIU.

(Institut Pasteur. Service des Virus [D^r LÉPINE]
et Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer [professeur G. PETIT].)

Nous avons essayé la transmission de deux virus aviaires, le virus de la maladie de Newcastle et celui de la variole aviaire, au poisson *Scyllium canicula*.

Le virus de la maladie de Newcastle est susceptible de se développer

chez plusieurs espèces animales en donnant une maladie apparente.

Le virus de la maladie de Newcastle employé est la souche « Var » 1949 [1], dont la virulence oscille entre 10^{-8} et 10^{-9} , et le pouvoir agglutinant entre 1/1 280 et 1/2 560. Cette souche a subi plus de 100 passages, toujours inoculée par la voie chorio-allantoïdienne à l'embryon de poulet de dix à onze jours d'incubation. Chez le poisson, nous avons employé comme matériel virulent du liquide chorio-allantoïdien infecté brut ou dilué. L'inoculation a été faite dans le télencéphale ou le diencéphale, ou par la voie intrapéritonéale.

Le virus de la variole aviaire a été isolé en 1949 sur des pigeons de Paris et entretenu depuis sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs embryonnés de onze jours d'incubation. Les membranes infectées de sept jours, broyées et diluées 10^{-2} , glycerinées à 10 p. 100, servent de matériel virulent inoculé par scarifications intradermiques.

Le poisson employé a été *Scyllium canicula*, sujets de 60 à 120 g, pêchés dans la région de Banyuls-sur-Mer (Laboratoire Arago). Les poissons ont été observés quelques jours en viviers avant de les inoculer avec l'un ou l'autre des virus.

A. — VIRUS DE NEWCASTLE.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Une dilution 10^{-2} du virus de Newcastle, souche « Var » 2609, DL_{50} $10^{-8,08}$, est inoculée à 5 *Scyllia* à raison de 0,15 ml par la voie intracérébrale.

Deux de ces poissons meurent d'une maladie intercurrente, les trois autres sont sacrifiés le septième jour. Pendant cette période, les trois poissons n'ont présenté aucun signe de maladie (leur vivacité était normale et leur orientation dans l'eau parfaite).

Les poissons sont sacrifiés au chloroforme. Les cerveaux prélevés stérilement sont broyés et dilués au 1/20. Ce matériel auquel on aura ajouté 500 U de pénicilline et 5 000 μ g de streptomycine sert à inoculer des œufs embryonnés afin de dépister la présence du virus de Newcastle. On inocule 0,10 ml de cette dilution par la voie chorio-allantoïdienne.

Tous les œufs sont morts entre le quatrième et le cinquième jour d'incubation avec toute la symptomatologie caractéristique de la maladie de Newcastle (mort par hémorragie, hémagglutination positive).

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — On se sert de la même souche de virus ayant subi récemment un passage sur embryon de poulet.

Le liquide chorio-allantoïdien brut est inoculé par voie intracérébrale à 5 *Scyllia* (102 à 106) de taille et de poids identiques. Ils ne présentent aucun signe de maladie jusqu'au septième jour, où ils sont sacrifiés.

Les cerveaux (fig. 1) prélevés comme décrit plus haut servent à inoculer des œufs embryonnés, qui meurent le quatrième jour d'une maladie de Newcastle typique.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — La souche ayant servi pour l'expérience 2 est inoculée par la voie intrapéritonéale, en plus de la voie intracérébrale, à 5 *Scyllia*.

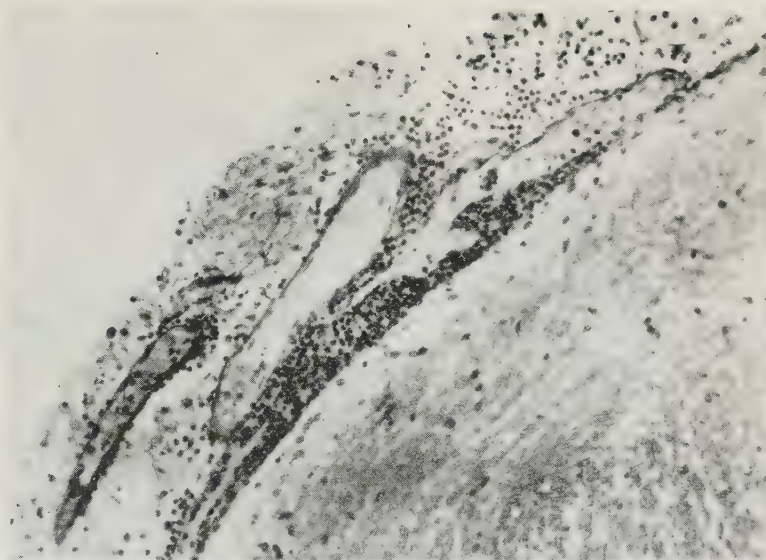


FIG. 1. — Virus de Newcastle souche Var., 1949. Poisson 102, sacrifié le septième jour. Forte méningite de la région du télencéphale. Gross.: 430 X.

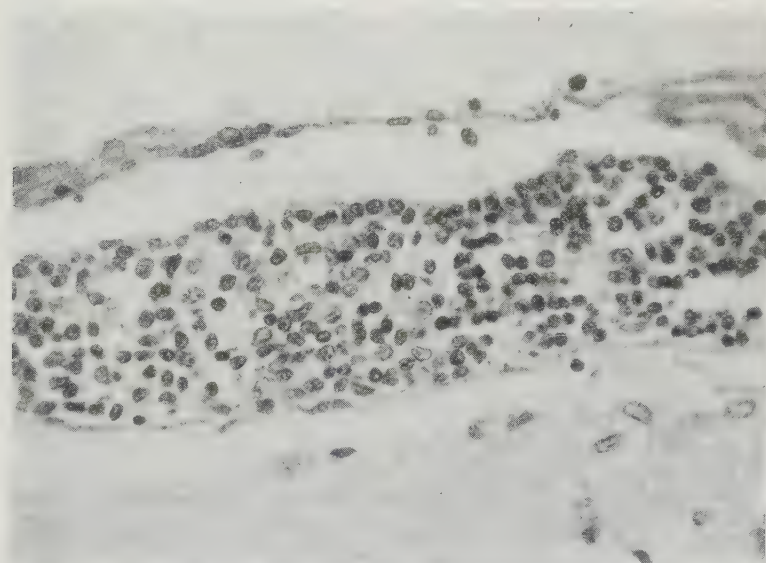


FIG. 2. — Même virus. Poisson 68, sacrifié le quatorzième jour. Couche épaisse à cellules mononucléaires dans les méninges de la région télencéphalique. Gross.: 380 X

On sacrifie 2 poissons les deux premières semaines, le dernier la troisième semaine. Les cerveaux inoculés dans le liquide chorio-allantoïdien d'œufs embryonnés ont chaque fois donné une culture de virus positive.

Le cerveau du poisson 68, sacrifié le quatorzième jour, sert à inoculer des œufs dans le liquide chorio-allantoïdien, et des poissons (185 et 186). Le passage sur œufs est positif.

Les poissons 185 et 186 sont sacrifiés huit jours après. Le broyat des cerveaux subit deux passages successifs sur œufs embryonnés, donnant chaque fois une maladie de Newcastle positive.

Au point de vue anatomo-pathologique, le poisson 68 (fig. 2) présentait une forte méningite à cellules mononucléaires et une légère infiltration diffuse dans le proencéphale.

B. — VARIOLE AVIAIRE.

L'inoculation par scarifications intradermiques du virus 1766 sur le côté droit de 5 poissons (5 à 10) a donné une lésion le septième jour chez un seul poisson. L'examen anatomo-pathologique, le passage chez l'embryon de poulet et d'autres poissons a montré qu'il s'agissait d'un processus inflammatoire banal. Nous n'avons pu déceler le virus variolique inoculé.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

Le virus de Newcastle, inoculé par la voie intracérébrale chez le *Scyllium canicula* est récupérable durant la première semaine (3 expériences) ainsi que les deuxième et troisième semaines. On trouve dans le cerveau des poissons des lésions de méningite spécifiques des maladies à virus ainsi qu'une légère encéphalite.

Le virus de Newcastle récupéré dans la deuxième semaine a donné une maladie inapparente chez deux poissons de même race, dont le deuxième passage a été positif. Le cerveau d'un poisson sacrifié durant la troisième semaine d'incubation contenait encore du virus.

En conclusion, le virus de la maladie de Newcastle inoculé à *Scyllium canicula* lui communique une maladie cliniquement inapparente et diagnostiquée par l'examen anatomo-pathologique, ainsi que par l'isolement après deux ou même trois semaines d'incubation, du virus inoculé.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LÉPINE, H. JACOTOT, P. ATANASIU et A. VALLÉE. Ccs *Annales*, 1949, 77, 84.

INFECTION A VIRUS ET MÉTABOLISME CELLULAIRE

I. — ABSORPTION ET LIBÉRATION D'ACIDES AMINÉS PAR LES CELLULES CHORIOALLANTOIQUES EN SURVIE

par C. HANNOUN et S. BRIEUX.

(*Institut Pasteur. Centre National de la Grippe.*
Service de M. R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE.)

La multiplication du virus de la grippe dans les cellules de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet comporte une modification de l'orientation des synthèses au sein des cellules infectées. Il est probable que cette déviation a des effets multiples sur le métabolisme cellulaire et que doivent exister certains effets, secondaires par rapport à la production du virus, mais néanmoins importants et mesurables. La connaissance de ces troubles secondaires peut aider à comprendre le mode d'action du virus. Certains auteurs ont recherché les modifications des activités enzymatiques cellulaires causées par différents virus, dont celui de la grippe (Bauer) [4]. D'autres ont démontré des différences notables de la teneur en certains métabolites essentiels, en certaines fonctions chimiques (Lomanto) [9], ou même en certains cations minéraux (Brieux) [5] dans les milieux infectés. Le virus grippal contenant 65 p. 100 de protéines, il est particulièrement important de s'attacher à l'étude du métabolisme protéique. Les études sur le pouvoir inhibiteur des analogues d'acides ont déjà montré que l'incorporation des amino-acides dans les molécules protéiques était directement liée à la synthèse du virus (Ackermann [4], Hannoun [8]).

Cependant, on ignore si cette incorporation des acides aminés a lieu d'une façon anormale dans les cellules infectées, c'est-à-dire si elle est qualitativement ou quantitativement différente du mécanisme normal.

Nous avons réalisé une série d'expériences pour rechercher de telles différences et préciser, en particulier, si les cellules infectées consomment plus ou moins d'acides aminés que les cellules normales.

TECHNIQUES. — Ces expériences ont été réalisées sur des suspensions cellulaires réalisées selon une technique adaptée de celle de Eaton [6] et consistant à introduire dans un milieu minéral simple des fragments de membrane chorioallantoïque d'embryons de poulet âgés de onze à douze jours. Les membranes sont hachées avec des ciseaux en fragments ne dépassant pas 2 mm dans leur plus grande dimension et on répartit cette suspension dans des fioles à raison d'environ une membrane par fiole. On ajoute alors 5 ml de milieu nutritif à chaque fiole et on inocule certaines fioles de 0,1 ml d'une dilution à 10^{-4} de liquide allantoïque infecté par le virus grippal A (PR8). Les fioles sont

portées à 37° et agitées lentement. Des prélèvements sont effectués à intervalles réguliers et le virus est titré par hémagglutination. Dans ces conditions, les cellules, sans se multiplier activement, restent au moins en survie pendant plusieurs jours, gardant intacte une partie de leur activité métabolique ainsi qu'en témoignent les changements de pH et de composition chimique du milieu ainsi d'ailleurs que la multiplication du virus. Les titres en virus sont inférieurs à ceux obtenus par culture *in ovo*, mais la simplicité de la composition du milieu rend plus aisées les analyses chimiques.

Les titrages d'amino-acides ont été effectués soit globalement par la technique à la ninhydrine d'Awapara [2], soit, pour certains, individuellement : tryptophane par la méthode de Bates [3], histidine par la méthode de Pauly modifiée [4].

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — 1° *Consommation d'amino-acides.* — Au cours des quelques heures qui suivent immédiatement la mise en route des expériences, nous avons constaté les faits suivants :

a) Dans le cas où aucun supplément d'amino-acides n'avait été ajouté, le milieu n'en contenait qu'une très faible quantité provenant de la suspension cellulaire et les dosages n'étaient pas possibles, les quantités mise en jeu étant de l'ordre de la limite inférieure de sensibilité des méthodes employées. Nous avons donc été amenés à ajouter au début de l'expérience un supplément d'acides aminés au milieu de culture.

b) En présence d'un supplément d'amino-acides (soit d'un seul : tryptophane ou histidine, soit d'un mélange comprenant glycine, leucine, lysine, phénylalanine, méthionine, thréonine, tryptophane, valine et isoleucine) nous avons constaté que la quantité d'amino-acides présente diminue progressivement. Les cellules fixent ou absorbent donc une certaine quantité d'amino-acides. Dans toutes nos expériences, *cette consommation a été plus rapide dans les cultures infectées de virus grippal*. On constate d'une part une diminution progressive de la quantité totale des amino-acides libres et, si l'on dose séparément certains d'entre eux, comme nous l'avons fait pour l'histidine et le tryptophane, on voit que leur concentration diminue d'une façon comparable.

Au cours de cette phase, le pH du milieu de culture diminue lentement mais régulièrement, *et il diminue plus vite dans les cultures non infectées*. Le pH des cultures infectées se maintient en effet toujours à une valeur supérieure de quelques dixièmes à celle des témoins.

2° *Libération d'amino-acides.* — Lorsque nous avons suivi l'évolution ultérieure de la composition du liquide de culture, nous avons constaté, avant même que le virus n'ait fait son apparition en quantité mesurable dans les cultures infectées, une augmentation importante de la teneur en amino-acides libres. Cette augmentation commence en général après la dixième heure de culture et met en jeu des quantités d'acides aminés plus grandes que celles impliquées dans le premier phénomène observé, masquant ainsi totalement son évolution ultérieure.

Elle a lieu même si aucun supplément d'amino-acides n'a été ajouté

au début de l'expérience. Cette libération s'est toujours révélée plus rapide et quantitativement plus importante dans les cultures infectées. La concentration en amino-acides dans ces cultures devient d'abord équivalente à celle des cultures normales puis la dépasse largement.

3° *Identification des amino-acides consommés ou libérés.* — Sans vouloir réaliser l'identification chromatographique complète des amino-acides consommés ou libérés, nous avons comparé les chromatographies en butanol acétique des amino-acides libres, présents dans les milieux de culture avec ou sans virus à des temps d'incubation différents. Nous n'avons pas trouvé de différences significatives entre les liquides provenant de cultures infectées ou normales. En effet, si les taches obtenues présentaient des intensités de coloration parfois légèrement différentes, nous n'avons pu trouver de différences qualitatives, c'est-à-dire mettre en évidence l'absorption ou la libération préférentielle de tel ou tel acide aminé privilégié.

De plus, l'examen d'hydrolysats de liquide allantoïque nous a permis de constater que les amino-acides des protéines du liquide correspondaient, en nombre et en proportions, à ceux libérés dans les liquides de culture. Ceci suggère que ces derniers pourraient provenir de l'hydrolyse enzymatique des protéines du liquide allantoïque, lesquelles ont pour origine les cellules de la membrane chorio-allantoïque.

DISCUSSION. — L'interprétation de ce double phénomène doit faire intervenir, d'une part la possibilité, pour les cellules présentes dans les cultures, d'utiliser les amino-acides du milieu pendant les premières heures de l'expérience, d'autre part l'existence d'une autolyse progressive de ces mêmes cellules, due au fait que le milieu dans lequel elles vivent n'est pas adapté à leur conservation en raison de la simplicité de sa composition.

Dans ces conditions, l'action du virus sur ces échanges consisterait en une stimulation de l'utilisation des amino-acides au cours de ce qui représente, pour le virus, la phase de latence, c'est-à-dire le moment où ont lieu les premiers stades de la synthèse des particules de virus, et en une augmentation de la vitesse d'autolyse des cellules au cours de la phase de libération du virus formé au cours du premier cycle de multiplication. Le premier effet est à rapprocher des données déjà connues sur l'action de l'infection sur les métabolismes cellulaires, alors que le second correspond aux images électroniques récentes (Wyckoff [43]) montrant la sortie du virus hors de la cellule par des sortes de protubérances protoplasmiques. On peut aussi le rapprocher des stades de destruction cellulaire observés chez la souris infectée expérimentalement par le virus grippal (Panthier, Cateigne, Hannoun [44]).

Il est cependant curieux de remarquer que la libération d'acides aminés commence seulement dix heures après le début de l'expérience, et ceci aussi bien dans les cultures normales que dans celles où se multiplie le virus. Si cette augmentation provenait de l'autolyse cellulaire spontanée, elle débiterait plus tôt, dès que les cellules seraient introduites dans le milieu de culture. Il faut donc admettre que les amino-acides proviennent de l'autolyse provoquée par une

cause bien définie qui ne peut être ici que l'épuisement des réserves cellulaires présentes au début de l'expérience et consommées pendant les premières heures, puis manquant presque subitement. Devant ces conditions peu favorables, les cellules les plus fragiles meurent, se lysent, ce qui procure aux survivantes une certaine quantité de matériaux nutritifs et permet leur survie pour un temps. En présence de virus, la consommation est accélérée pendant la première phase puis, la pénurie survenant, la phase de lyse est plus intense encore que dans les cultures sans virus.

La différence dans l'évolution du pH du liquide de culture correspond au phénomène étudié par Parodi [42] puis par Fauconnier [7] *in ovo*. Dans le cas présent, il n'y a que quelques dixièmes d'écart, mais seul le premier cycle de multiplication a eu lieu alors que l'évolution du phénomène dans l'embryon de poulet comprend plusieurs cycles de multiplication.

CONCLUSIONS. — Les cellules chorioallantoïques maintenues en survie consomment d'abord une partie des amino-acides présents dans le milieu puis, probablement à la suite de processus autolytiques, commencent à libérer, après une dizaine d'heures, une grosse quantité d'acides-amino. En présence de virus grippal, la phase de consommation est plus rapide et plus intense, la phase de libération est également plus intense. Les techniques employées, malgré leur sensibilité, n'ont pas permis de démontrer de différence qualitative au cours de la consommation comme au cours de la libération.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] W. W. ACKERMANN. *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 337.
- [2] J. AWAPARA. *J. biol. Chem.*, 1949, **178**, 113.
- [3] R. W. BATES. *J. biol. Chem.*, 1937, **119**, 7.
- [4] D. J. BAUER. In *The nature of virus multiplication* 1952, p. 42, Cambridge, Univ. Press.
- [5] S. BRIEUX. *VI^e Congrès International de Microbiologie*. Rome, 1953.
- [6] M. D. EATON. *Arch. ges. Virusf.*, 1952, **5**, 53.
- [7] B. FAUCONNIER. *Ces Annales*, 1953, **84**, 474.
- [8] C. HANNOUN. *C. R. Acad. Sci.*, 1952, **235**, 1340.
- [9] H. A. LOMANTO. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 1952, **28**, 109.
- [10] H. T. MACPHERSON. *Biochem. J.*, 1946, **40**, 470.
- [11] R. PANTHIER, G. CATEIGNE et C. HANNOUN. *Ces Annales*, 1948, **75**, 338.
- [12] A. S. PARODI et coll. *J. Immunol.*, 1948, **58**, 109.
- [13] R. W. G. WYCKOFF. *J. Immunol.*, 1953, **70**, 187.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Etude critique de diverses méthodes utilisées pour apprécier l'activité d'un vaccin anti-typhoïdique, par M^{mes} J. GRABAR et S. LE MINOR.

Contribution à l'étude sérologique de la réaction d'agglutination des globules rouges sensibilisés par un immun-sérum, par E. JOCHEM, A. EYQUEM et F. JACQUELINE.

Action des antibiotiques et des sulfamides *in vivo* sur les bactéries aérobies sporogènes, par C. TOUMANOFF et B. VIRAT.

Caractères histopathologiques de la réticulose expérimentale mortelle du lapin provoquée par les corynébactéries anaérobies, par A.-R. PRÉVOT, J. LEVADITI, P. TARDIEUX et M^{me} O. NAZIMOFF.

Etudes sur les bactéries ligninolytiques. II. Caractères des bactéries ligninolytiques isolées du sol, par G. FISCHER, B. BIZZINI, M. RAYNAUD et A.-R. PRÉVOT.

CONGRÈS

Congrès et Expositions internationaux des distributions d'eaux. Londres, 18 au 23 juillet 1955. Renseignements : Mr. Leonard Millis, Secrétaire général, 34 Park Street, Londres W. 1, Angleterre.

V^e Anniversaire de l'American Trudeau Society, Milwaukee, Wisconsin (U. S. A.), du 23 au 27 mai 1955. Renseignements : National Tuberculosis Association, 1790 Broadway, New York 19, N. Y. (U. S. A.).

LIVRES REÇUS

F. Bolle. — *Mensch und Mikrobe. Abenteuer im Unsichtbaren.* 1 vol., 396 p., 118 fig. dont 101 hors texte. Safari Verlag, édit., Berlin, 1954. Prix : DM : 16,80.

On ne peut guère parler de vulgarisation lorsqu'il s'agit, comme dans ce volume, de connaissances aussi approfondies et aussi modernes que celles qui y sont exposées. L'auteur, tout en cherchant à rendre son livre aussi attrayant que possible (et notamment par des illustrations qui vont des dessins d'Albert Dürer à des photographies de virus au microscope électronique), met le lecteur en présence des problèmes les plus divers et les plus actuels, comme ceux de la forme de la molécule de l'acide ribonucléique et de son rôle dans la reproduction du bactériophage, du croisement et de la « résurrection des morts » chez les phages, ou bien des recherches sur le système nerveux végétatif et la « réaction d'alarme ». L'ouvrage commence par une description de toutes les grandes épidémies qui ont ravagé le monde depuis les temps historiques : la peste et les paniques qu'elle répandait, la lèpre et l'évolution qui, du lépreux, malheureux réprouvé, a fait un être dont la vie, dans les îles qui lui

sont réservées, se rapproche autant que faire se peut d'une vie normale ; le choléra, la syphilis, la variole, le paludisme, le typhus, etc., le tout illustré de nombreuses figures, tantôt réalistes, tantôt humoristiques. Puis l'auteur raconte l'histoire de la découverte des microbes et comment peu à peu, des pratiques magiques, on en est arrivé à la science expérimentale, à celle des faits, et c'est l'occasion pour lui de nous faire connaître d'une manière fort divertissante la vie de Leeuwenhoek, Jenner, Semmelweis, Pasteur, Koch, etc. Les deux chapitres suivants : « La vie mystérieuse des microbes » et « Les virus, ces êtres énigmatiques », tiennent le lecteur en haleine d'un bout à l'autre. D'autres sont consacrés à l'aventure de la chimiothérapie, commençant avec Ehrlich, se poursuivant avec les sulfamides, puis continuée ensuite par la découverte des champignons producteurs d'antibiotiques. Nous savions déjà qu'il existait des microbes utiles : ceux qui interviennent dans le cycle de l'azote, ceux de la flore intestinale, etc. D'autres ont été utilisés sciemment par l'homme et toute l'industrie des fermentations repose sur les microbes. Il ne faut pas oublier non plus, malgré les objections des gourmets, la précieuse ressource qui nous mettra à l'abri des famines à venir et qui est constituée par les algues et le plancton, celui-ci représentant, paraît-il, pour le seul Océan Atlantique la valeur nutritive de 20 000 récoltes mondiales de blé.

Si ce livre ne peut rien apprendre aux spécialistes, tous les esprits curieux se passionneront pour les nombreuses connaissances qu'il met à leur portée, pour son style clair et vivant, toutes les anecdotes qu'il raconte et tous les problèmes sur lesquels il ouvre des aperçus.

Terminons comme l'auteur, en souhaitant qu'après tant de merveilleuses découvertes « on trouve enfin le microbe de la bêtise humaine et son vaccin, ce qui éviterait les frontières, les guerres, et permettrait de supprimer toute la diplomatie internationale et de la remplacer par le simple bon sens ».

H. T.

Report of the Medical Research Council for the year 1952-1953. — 1 vol., 269 p., London, Her Majesty's Stationery Office, édit., 1954. Prix : 7 s. 6 d.

Le Gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1955. — 1^{er} Trimestre. — Numéro d'ordre 2111. — Masson et Cie, édit., Paris.
Ancien Imp. de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.